



Élucidation du rôle de nouveaux acteurs de la biosynthèse de Q8 chez *Escherichia coli* et caractérisation du complexe protéique de biosynthèse de Q8.

Mahmoud Hajj Chehade

► To cite this version:

Mahmoud Hajj Chehade. Élucidation du rôle de nouveaux acteurs de la biosynthèse de Q8 chez *Escherichia coli* et caractérisation du complexe protéique de biosynthèse de Q8.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV010 . tel-01388421

HAL Id: tel-01388421

<https://theses.hal.science/tel-01388421>

Submitted on 27 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« Mahmoud HAJJ CHEHADE »

Thèse dirigée par « **Fabien PIERREL** » et
codirigée par « **Marc FONTECAVE** »

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des
Métaux (LCBM)**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant (EDCSV)**

Élucidation du rôle de nouveaux acteurs de la biosynthèse de Q₈ chez *E. coli* et caractérisation du complexe protéique de la biosynthèse de Q₈

Thèse soutenue publiquement le « **26 octobre 2015** »,
devant le jury composé de :

M^{me}. Barbara SCHOEPP-COTHENET

Directeur de recherche, CNRS, Université Aix Marseille, Rapporteur

Mr. Jean-Jacques LACAPERE

Directeur de recherche, CNRS, UPMC, Rapporteur

M^{me}. Marianne GUIRAL

Chargé de recherche CNRS, Université Aix Marseille, Examineur

Mr. Jacques BOURGUIGNON

Directeur de recherche, CEA, Université Joseph Fourier, Examineur

Mr. François BOUCHER

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Président

Mr. Fabien PIERREL

Chargé de recherche CNRS, Université Joseph Fourier, Directeur de
thèse



Remerciement

Une thèse est loin d'être le résultat d'un travail solitaire. Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

A ce titre, je remercie en premier lieu le directeur du laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Dr. Stéphane Ménage pour m'avoir accueilli dans le laboratoire et permis de travailler dans des excellentes conditions.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ma thèse: Mme Barbara Schoepp-Cothenet, Mr. Jean Jacques Lacapère, Mme Marianne Guiral, Mr. Jacques Bourguignon et Mr. François Boucher.

Bien évidemment un merci tout particulier revient à mon directeur de thèse, Dr. Fabien PIERREL pour la confiance qu'il m'a accordée, son inestimable disponibilité, la qualité de son encadrement, ses conseils avisés et son enthousiasme communicatif. J'aimerais te dire, Fab, à quel point j'ai apprécié ta patience à suivre la rédaction de cette thèse, soulevant un nombre de questions dont la pertinence m'a amené à améliorer et approfondir mes compétences en rédaction.

J'ai été honoré que le Prof. Marc Fontecave soit le co-directeur de ma thèse. Je te remercie Marc pour ton suivi attentif et l'intérêt que tu as manifesté dans mes travaux ainsi que pour ton invitation au collège de France et les échanges que j'ai eu avec l'ensemble de l'équipe chimie des processus biologiques. Je tiens aussi à remercier l'ensemble de ton équipe pour leur contribution au travail sur la structure d'UbiL.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse Mr. Dominique Schneider et Mr. Jacques Bourguignon pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les remarques constructives qu'ils ont fait sur mon projet de thèse.

J'exprime mes profonds remerciements à l'ensemble de collaborateurs notamment Laurent Loiseau et Laurent Aussel pour leur aide et leur contribution dans ce sujet de thèse. Merci Sabine et Yohann pour m'avoir aidé dans l'analyse des données protéomiques.

Un merci du fond du cœur aux chercheurs permanents des équipes Biocat et BioCe, particulièrement Etienne, Hamid, Kiki, Cathy, Vincent, Victor, Christelle, Sandrine, Caro, Adeline, Olivier, Stéphane Torelli et Jennifer. Merci pour votre aide, votre amitié ainsi que pour les bons moments passés en votre compagnie.

Remerciement

Un grand merci aux collègues du labo, les non permanents: Steph (Gisèle), Debby, Denis, Alice, Marina (ça va me manquer de râler ensemble), Marine, Béa (Lucienne), Jenny, Marc André, Thibault, Nico K., Laurianne, Trevor, Marine, Gustav, Jayoné...

Pavel, Ulrika, Mélanie et Laurie-Anne ou notre petit groupe BioQ, merci beaucoup pour votre aide, votre amitié et vos conseils précieux.

Je remercie également mon tuteur d'enseignement, Dr. Ludovic PELOSI pour son accompagnement, ses conseils et sa confiance en moi.

C'est durant ces années d'études que j'ai compris que c'est par l'intermédiaire de nos amis que Dieu prend soin de nous. C'est pour cette raison que je remercie du fond du coeur tous mes amis qui m'ont reconforté dans les périodes difficiles et qui m'ont entouré de leur sympathique compréhension. Makouchi, Radroud, Chahroua, Mimo, Wily, Hous, Abou Jawad, Hassan, Sara, Sundoura, Abou Mohamad, Marc, Wifa, Jérémy, Mariam Krit, Hind, Riham, Abir, Nouha, Wiss, Elissar. Merci pour les bons moments passés avec vous surtout les soirées de Chicha. Merci aussi à Dr. Ozeir pour son support pendant les 5 ans de travail sur Q.

J'aimerais dédier cette thèse à mes parents qui ont sacrifié leur vie pour privilégier mon éducation. J'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance à l'aide considérable, morale ou matérielle qu'ils m'ont apportée jusqu'à l'achèvement de ce travail.

ABBREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE	3
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. LES QUINONES :	4
I.1. Groupes :	4
I.1.a. les benzoquinones :	4
I.1.b. les naphthoquinones :	4
I.2. La chaine polyisoprényle :	6
I.3. Potentiel rédox :	6
I.4. Rôles des quinones chez les eucaryotes :	7
I.4.a. Transporteurs d'électrons et des protons dans la chaine respiratoire mitochondriale :	7
I.4.b. Anti-oxydant :	8
I.4.c. Autres fonctions proposées du coenzyme Q :	10
I.4.d. Déficience de Coenzyme Q chez les eucaryotes	11
I.5. Les quinones bactériennes :	11
I.5.a. Distribution phylogénétique des quinones bactériennes	12
I.5.b. Rôles des quinones chez la bactérie <i>E. coli</i> :	14
I.5.b.1. Transporteurs d'électrons dans la chaine respiratoire :	14
I.5.b.2. Formation des ponts disulfures :	15
I.5.b.3. Rôle de Q ₈ dans la protection contre le stress osmotique :	16
II. LES DIFFERENTS SYSTEMES RESPIRATOIRES CHEZ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	17
II.1. La fermentation chez <i>E. coli</i> :	17
II.2. La respiration chez <i>E. coli</i> :	19
II.2.a. Les déshydrogénases :	19
II.2.b. La chaine respiratoire aérobie chez <i>E. coli</i> :	20
II.2.b.1. Quinol bo ₃ ubiquinol oxydase :	20
II.2.b.2. Quinol bdI ubiquinol oxydase :	21
II.2.b.3. Quinol bdII ubiquinol oxydase :	21
II.2.b.4. Utilisation des quinones par les quinols oxydases :	22
II.2.c. La chaine respiratoire anaérobie chez <i>E. coli</i> :	23
II.3. Contrôle de l'expression des enzymes respiratoires	24
II.3.a. Système Arc	24
II.3.b. Système FNR :	26
II.4. Régulation du taux de quinones :	27
III. BIOSYNTHESE DES QUINONES CHEZ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	28
III.1. Biosynthèse du coenzyme Q₈:	28

III.2. Les étapes de biosynthèse du Q₈:	30
III.2.a. Biosynthèse du 4-hydroxybenzoate, le précurseur du noyau aromatique du Q ₈ :	31
III.2.b. Biosynthèse et liaison de la chaîne octaprényle :	31
III.2.b.1. La voie mévalonate :	32
III.2.b.2. La voie MEP :	32
III.2.b.3. Biosynthèse de la chaîne octaprényle :	32
III.2.b.4. Liaison de la chaîne octaprényle :	34
III.2.c. Décarboxylation du 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate	36
III.2.d. Réactions de méthylation :	38
III.2.d.1. Méthylation en C2 :	39
III.2.d.2. Méthylations en O5 et O6 :	39
III.2.e. Réactions d'hydroxylation :	39
III.2.e.1. Hydroxylation en C5 :	40
III.2.e.2. Les deux autres réactions d'hydroxylation :	40
III.2.e.2.i. Identification des protéines UbiH et UbiF:	40
III.2.e.2.ii. Mécanisme catalytique de monooxygénases à flavine du groupe A:	42
III.2.e.3. Origine des atomes oxygène :	44
III.2.e.4. Les réactions d'hydroxylation en anaérobiose :	44
III.3. Régulation de gènes de biosynthèse de coenzyme Q :	45
III.4. Biosynthèse des naphthoquinones :	45
 IV. L'ORGANISATION DES PROTEINES DE BIOSYNTHESE DE Q EN COMPLEXE : CONSERVEE OU NON ?	 48
IV.1. Mise en évidence d'un complexe protéique chez <i>S. cerevisiae</i> :	48
IV.1.a. Les mutants Δcoq accumulent du HHB :	48
IV.1.b. La surexpression de Coq8 stabilise le complexe protéique :	49
IV.1.c. Caractérisation du complexe protéique :	49
IV.2. Mise en évidence d'un complexe protéique chez les mammifères :	52
IV.3. Mise en évidence d'un complexe protéique chez <i>E. coli</i> :	52
 V. BUT DU TRAVAIL :	 54
 MATERIELS ET METHODES	 57
A- Matériels	57
1- Souches bactériennes utilisées	57
2- souche de levure	58
3- Vecteurs plasmidiques utilisés	58
4- Milieux de culture	61
4-a- Culture d' <i>E. coli</i>	61
4-b- Culture de <i>S. cerevisiae</i>	61
5- conditions de culture :	62

6- Anticorps utilisés	63
B-Méthodes	64
1- Préparation des fractions membranaires des souches Ubi-SPA par fractionnement cellulaire	64
2- Solubilisation de protéines Ubi membranaires	65
3- Analyse du degré d'association de protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA à la membrane	66
4- Gradient de sucrose	66
5- Préparation des extraits cellulaires totaux	67
6- Electrophorèse sur gel SDS-PAGE et immunodétection sur membrane de nitrocellulose	67
6-a- Electrophorèse sur gel SDS-PAGE	67
6-b- Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose :	68
6-c- Immunodétection des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose	68
7- Electrophorèse sur gel BN-PAGE et immunodétection sur membrane PVDF	69
7-a- Système BN-PAGE	69
7-b- Electrophorèse sur gel BN-PAGE	70
7-c- Transfert des protéines sur membrane PVDF	71
7-d- Electrophorèse en 2 ^{ème} dimension sur gel SDS-PAGE	71
7-e- Immunodétection des protéines transférées sur membrane de PVDF	72
8-Analyse des extraits lipidiques par HPLC-ECD	72
8-a- Extraction lipidique à partir des cellules	72
8-b- Analyse par HPLC des extraits lipidiques	73
8-c- Analyse des extraits lipidiques par spectrométrie de masse	74
9-Méthodes préparatoires pour la purification et l'analyse de DQs	74
9-a-Extraction lipidique à partir de la culture des cellules	74
9-b- Purification sur colonne de Silice:	75
9-c- Analyse du composé purifié par spectrométrie de masse	75
10- Analyse protéomique de fragment de gel BN-PAGE excisé	76
10-a- Extraction peptidique de fragments de gel BN-PAGE	76
10-b- Analyse par LC-MS/MS	76
11- Extraction plasmidique	77
12- Spectroscopie d'absorption UV-visible	77
13- Transformation des bactéries	77
13-a- Préparation de cellules compétentes	78
13-b- Transformation des bactéries par choc thermique	78
14- Dosage de protéines par BCA	78
 CHAPITRE I : VISC (UBII) EST LA MONOOXYGENASE QUI CATALYSE L'HYDROXYLATION EN C5	 80

1- Introduction :	80
3- Discussion	90
CHAPITRE II : UBIJ (YIGP) ET UBIK (YQIC) SONT DEUX NOUVEAUX ACTEURS DE BIOSYNTHESE AEROBIQUE DE Q₈	93
1- Mise en évidence des protéines YqiC et YigP :	93
2- YqiC et YigP sont essentielles pour la biosynthèse aérobie de Q ₈	93
3- Expression d'UbiJ et d'UbiK en aérobie /anaérobie :	96
4- Les 50 acides aminés terminaux d'UbiJ sont importants pour la biosynthèse de Q ₈ chez <i>S. typhimurium</i> et <i>E. coli</i> :	97
5- L'activité biologique d' <i>ubiJ</i> de <i>S. typhimurium</i> nécessite la synthèse d'une protéine :	99
6- Effet de la mutation d'UbiK dans des mutants <i>Δubi</i> :	100
7- Fractionnement cellulaire et localisation cellulaire des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA :	104
7-a- choix du tampon de lyse :	104
7-b- Répartition des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA :	105
8- Localisation membranaire des protéines UbiJ et UbiK :	107
DISCUSSION	108
CHAPITRE III : REGROUPEMENT DES PROTEINES UBI EN COMPLEXE PROTEIQUE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE	111
1- Le tag SPA n'affecte pas l'activité des protéines Ubi :	111
2-Détection des protéines Ubi-SPA :	112
3- Fractionnement cellulaire et localisation des protéines Ubi-SPA :	113
4- Analyse des protéines Ubi membranaires :	114
a- tests de solubilisation :	114
4-b- Analyse des fractions membranaires solubilisées sur gel BN-PAGE :	116
4-c- Etude de l'interaction entre UbiJ et UbiK :	118
5- Analyse des protéines Ubi solubles :	120
5-a- Analyse de fractions solubles sur gel BN-PAGE :	120
5-b- analyse protéomique des fragments du gel BN-PAGE	121
5-b-i- analyse protéomique du fragment du gel BN-PAGE excisé de la souche UbiH-SPA correspondant à une taille de protéines de 1000 kDa	121
5-b-ii- analyse protéomique des fragments du gel BN-PAGE excisés des souches UbiH-SPA et UbiI-SPA correspondant à une taille de protéines de 800 kDa	124
5-b-ii-1- Les protéines Ubi migrent à 1000 kDa	126
5-b-ii-2- Le tag SPA sur UbiI perturbe la migration du complexe sur BN-PAGE	126
5-c- Effet des mutations d'UbiJ et d'UbiK sur la distribution des protéines solubles :	127

5-c-i- Analyse du taux de Q ₈ produit dans les souches –SPA inactivées pour <i>ubiJ</i> ou <i>ubiK</i> :	127
5-c-ii- Répartition des protéines Ubi–SPA dans les souches inactivées pour <i>ubiJ</i> ou <i>ubiK</i> :	129
5-d- Effet de la délétion d' <i>ubiK</i> sur la distribution de protéines solubles en BN-PAGE :	129
5-e- Effet de la délétion d' <i>ubiJ</i> sur la répartition des protéines solubles sur BN-PAGE:	131
5-f- analyse protéomique des fragments du gel excisés :	132
5-f-i- La délétion d' <i>ubiJ</i> affecte le niveau d'expression des protéines Ubi	132
5-f-ii- La délétion d' <i>ubiJ</i> affecte le niveau d'expression d'autres protéines	134
DISCUSSION	136
CHAPITRE IV : BIOSYNTHESE DE Q₈ EN ANAEROBIOSE	143
1- Biosynthèse anaérobie de Q ₈ dans les mutants de monooxygénases	143
2- Expression des protéines UbiH, UbiI et UbiF en conditions anaérobies	144
3- Recherche des hydroxylases anaérobies	145
4- Etude de la souche YhbT-SPA	147
4-a- Quantification des quinones dans YhbT-SPA	147
4-b- Expression d'YhbT-SPA en anaérobiose	148
5- Recherche de la source d'oxygène pour les réactions d'hydroxylation anaérobie	149
6- <i>AubiE</i> cultivée en anaérobiose accumule de la diméthylubiquinone	153
6-a- Analyse de la DDMQ ₈	154
6-b- Analyse du composé d'intérêt	155
DISCUSSION	157
CONCLUSION GENERALE	161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164

Abbreviations

Q	Ubiquinone ou coenzyme Q
PQ	Plastoquinone
DMK	Déméthylménaquinone
MK	Ménaquinone
MEP	2-C-méthyle-D-érythritol 4-phosphate
ATP	Adénosine triphosphate
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
ROS	Reactive oxygen species
WT	souche sauvage
LUCA	Last universal common ancestor
GOE	Great oxidant event
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
TMAO	Triméthylamine N-oxyde
<i>Δubi</i>	mutant par délétion du gène <i>ubi</i>
fnr	Ferredoxine - NADP ⁺ réductase
Arc	Aerobic respiratory controle
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
4-HB	4-hydroxybenzoate
OHB	3- Octaprényle-4-hydroxybenzoate
HHB	3- hexaprényle-4-hydroxybenzoate
DDMQ	Déméthyl-déméthoxyquinone
DMQ	Déméthoxyquinone
SAM	S-adénosyl-méthionine
IPP	Isopentényl diphosphate
DMAPP	Diméthyl-allyl diphosphate
VA	Acide vanillique

Abbreviations

pABA	parahydroxybenzoate
FMN	Flavine mononucléotide
FAD	Flavine adénine dinucléotide
PHBH	p-hydroxybenzoate hydroxylase
DHNA	1,4-dihydroxy-2-naphtoate
BN-PAGE	Blue native polyacrylamid gel electrophoresis
Δcoq	Mutant de levure par délétion du gène COQ
HPLC-ECD	High Performance Liquid Chromatography Coupled To Electrochemical Detection
MS	Spectrométrie de masse
PPM	Partie Par Million
RPM	Tours par minute
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamid Gel Electrophoresis
4-HP ₈	3-octaprényl-4-hydroxyphénol
RMN	Résonance magnétique nucléaire
H ₂ O ₂	péroxyde d'hydrogène
O ₂ ⁻	radical superoxyde
LOO°	radical lipidique hydroxylé
OH°	radical hydroxyde
UV	Ultra-violet
SIM	Selected Ion Monitoring
TEMED	Tétraméthyléthylenediamine
APS	Ammonium persulfate
PVDF	Polyvinylidene fluoride
iBAQ	intensity Based Absolute Quantification

Introduction générale

Le coenzyme Q (ubiquinone ou Q) est une molécule organique lipophile composée d'un noyau aromatique de type « benzoquinone » substitué notamment d'une chaîne polyisoprényle (plusieurs unités isoprènes) dont la longueur varie selon les organismes, 6 unités chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Q₆), 8 chez *Escherichia coli* (Q₈) et 10 chez les humains (Q₁₀). La capacité de Q à échanger deux électrons au cours du cycle rédox lui permet de passer d'une forme réduite à une forme oxydée. Cette capacité lui confère un rôle bien connu de transporteur d'électrons dans les chaînes respiratoires en plus de fonctionner également comme un antioxydant membranaire.

La biosynthèse de Q est conservée, des bactéries à l'homme avec quelques différences mineures et nécessite chez *Escherichia coli* la participation d'au moins 9 protéines (UbiA-UbiH et UbiX). Le 4-hydroxybenzoate (4-HB) est le précurseur du noyau aromatique de Q, dérive du chorismate par une réaction catalysée par UbiC. UbiA assure sa prénylation par ajout de la chaîne octaprényle sur le carbone 3. La biosynthèse de Q se poursuit avec sept étapes de modification des substituants du noyau benzénique dont au total il y a trois réactions d'hydroxylation, trois réactions de méthylation et une réaction de décarboxylation. Des études génétiques et biochimiques menées chez *S. cerevisiae* ont montré que la plupart des protéines de biosynthèse de Q sont regroupées au sein d'un complexe multiprotéique associé à la membrane interne mitochondriale. L'existence d'un tel complexe chez *E. coli* n'a pas été documentée, mise à part l'étude faite par Knoell en 1979 qui suggère la présence d'un complexe soluble de taille 2 MDa capable de convertir le 3-octaprényl-4-hydroxybenzote (OPP) en Q. Toutefois, le complexe de biosynthèse de Q chez les deux organismes (*S. cerevisiae* et *E. coli*) n'a jamais été purifié et donc ni sa composition exacte ni les modalités de son assemblage ne sont connues.

De nombreuses inconnues subsistent dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez *E. coli*: en plus de l'ambiguïté qui entoure le rôle exact d'UbiB, on ne connaît pas la fonction de certains gènes pourtant essentiels à la biosynthèse de Q en conditions aérobies (*yigP* et *yqiC*) et en conditions anaérobies (*yhbT*). Les mutants correspondants à ces gènes accumulent tous l'OPP, un intermédiaire précoce dans la voie de biosynthèse qui ne constitue pas un intermédiaire diagnostique de l'étape de biosynthèse déficiente. Cela a rendu compliquée l'élucidation des fonctions exactes de ces gènes. Au cours de cette thèse, nous avons cherché d'une part à découvrir les fonctions de ces nouvelles protéines et d'autre part à mettre en évidence la présence d'un complexe multiprotéique regroupant la majorité des protéines Ubi.

Introduction bibliographique

I. Les quinones :

Les quinones isoprénoides sont des composés lipophiles largement répandues dans la nature (**Soballe *et al.* 1999**). La structure de ces quinones consiste en une tête polaire hydrophile et une chaîne latérale hydrophobe. Sur la base du noyau polaire, les quinones isoprénoides sont divisées en 2 groupes : les benzoquinones et les naphtoquinones (figure 1). La chaîne isoprénoïde apolaire confère à ces molécules leur caractère liposoluble facilitant ainsi leur ancrage dans les bicouches lipidiques membranaires.

I.1. Groupes :

I.1.a. les benzoquinones :

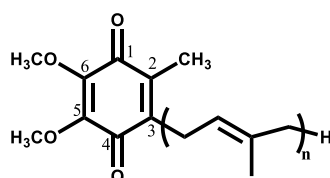
Les deux groupes les plus répandus de benzoquinones sont les ubiquinones (coenzyme Q ou simplement Q, composé A, figure 1) et les plastoquinones (PQ, composé C, figure 1) qui diffèrent par les substituants des noyaux quinones (**Collins *et al.* 1981**). La numérotation des atomes de carbone sur le cycle benzénique est indiquée sur la figure 1A. Alors que Q est présent chez de nombreuses bactéries et chez les eucaryotes, la PQ est présente chez les plantes. La rhodoquinone (composé G, figure 1) est rencontrée chez *Rhodospirillum rubrum* et possède un groupe amine sur le carbone 6. *Caldariella acidophila* est une bactérie thermophile et acidophile qui contient la caldariellaquinone (composé E, figure 1) dont le noyau benzoquinone comporte un second cycle contenant un atome de soufre.

I.1.b. les naphtoquinones :

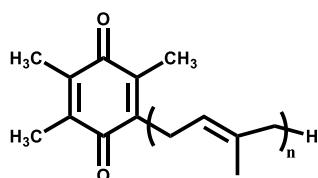
Le noyau naphtoquinone est formé de 2 cycles (marqués A et B sur le composé B de la figure 1) et provient du chorismate (voir figures 20 et 21). La chaîne polyisoprényle substitue l'atome de carbone 3. La phylloquinone (composé F, figure 1), connue aussi sous le nom de vitamine K₁ est largement répandue chez les plantes (**Meganathan 2001**). La vitamine K₁ intervient au niveau du foie pour la synthèse protéique de facteurs de la coagulation sanguine. Les

ménaquinones (déméthylménaquinone (DMK, composé D, figure 1) et ménaquinone (MK, composé B, figure 1)) sont présentes chez la plupart des bactéries. MK et DMK diffèrent par la présence d'un groupement méthyl sur le carbone 2 (figures 1B et 1D).

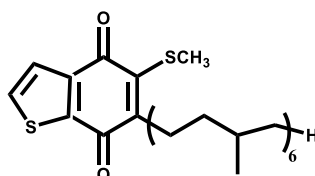
Benzoquinones



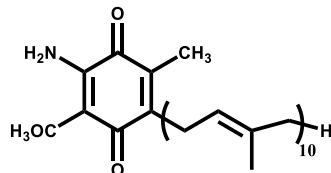
A- Ubiquinone



C- Plastoquinone

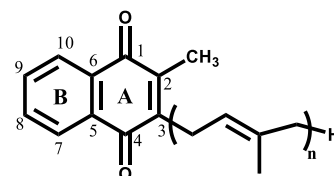


E- Caldariellaquinone

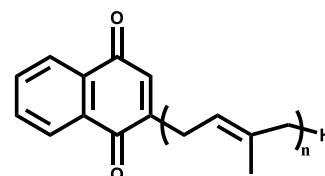


G- Rhodoquinone

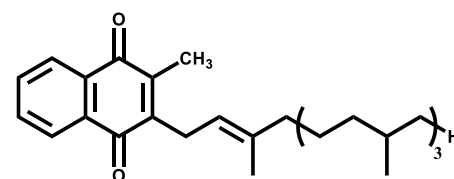
Naphtoquinones



B- Ménaquinone



D- déméthylménaquinone



F- Phylloquinone

Figure 1 : Structure des différentes quinones isoprénoides : « n » représente le nombre des unités isoprènes qui diffère entre les organismes. Les noyaux A et B (voir texte, I.2.b.) de la tête naphtoquinone sont indiqués sur le composé B.

I.2. La chaîne polyisoprényle :

La chaîne polyisoprényle représente la partie hydrophobe des quinones qui les rend liposolubles. Elle est commune à la structure de l'ubiquinone et des naphthoquinones. Chez les eucaryotes, la chaîne est formée à partir de la voie mévalonate tandis que chez la plupart des bactéries, elle est formée à partir du 2-C-méthyle-D-érythritol 4-phosphate (MEP), un intermédiaire de la voie non-mévalonate (**Rohmer 1999**). Les deux voies seront décrites dans la partie III (III.2.b.). La longueur de la chaîne dépend du nombre d'unités isoprènes qui est fixé par la polyprényle diphosphate synthase : Chez *E. coli*, il y a 8 unités isoprènes d'où la nomenclature d'une chaîne octaprényle (Q_8 , MK_8 et DMK_8), 6 unités chez la levure *Sacharromyces cerevisiae* (Q_6) et 10 unités chez l'homme (Q_{10}).

Certains organismes possèdent plus qu'un seul type de coenzyme Q mais généralement, une seule forme est dominante. En effet, la plupart des mammifères, y compris les humains synthétisent une faible quantité du coenzyme Q_9 en plus du coenzyme Q_{10} alors que le coenzyme Q_9 est majoritairement synthétisé chez les rongeurs (**Nowicka et al. 2010**). La bactérie *Escherchia coli* présente aussi une quantité minoritaire de Q_7 en plus de la forme majoritaire de Q_8 .

I.3. Potentiel rédox :

Le noyau quinone passe par deux étapes de réduction réversibles pour donner la forme quinol (figure 2). Ainsi l'ubiquinone et la ménaquinone sont réduites en ubiquinol et ménaquinol, respectivement. L'addition d'un électron et d'un proton à la forme oxydée résulte en une forme (ubi ou ména)-semiquinone. L'addition d'un second électron et d'un second proton génère la forme réduite quinol (figure 2). Les potentiels rédox de différentes quinones sont les suivants 112 mV pour Q_8 / Q_8H_2 , 36 mV pour DMK_8 / DMK_8H_2 et -74 mV pour MK_8 / MK_8H_2 (**Unden and Bongaerts 1997**). Cette propriété chimique fait des quinones des médiateurs appropriés pour le transfert des protons et des électrons entre les complexes protéiques respiratoires des membranes biologiques.

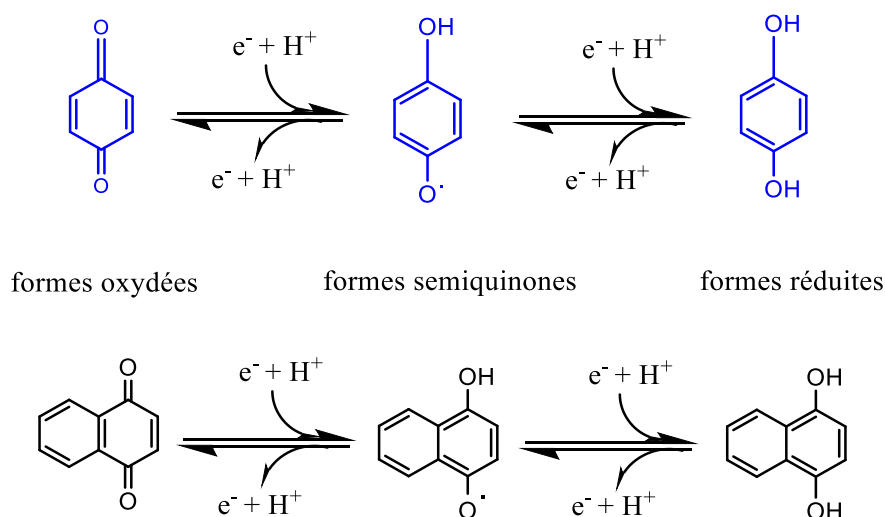


Figure 2 : Les différents états d'oxydation du noyau quinone : Les formes oxydées, semiquinones et réduites sont représentées pour les noyaux benzoquinone et naphthoquinone.

I.4. Rôles des quinones chez les eucaryotes :

Chez les eucaryotes, DMK et MK ne sont pas présentes. Les quinones chez ces organismes sont divisées en deux groupes : photosynthétique et non photosynthétique. Le coenzyme Q (non photosynthétique) est présent dans toutes les membranes. La plastoquinone (PQ) (forme photosynthétique) est la benzoquinone présente dans la chaîne de transfert des électrons de l'appareil photosynthétique chez les plantes supérieures et dans la chaîne photosynthétique des cyanobactéries. Dans la suite de cette partie, seuls les rôles du coenzyme Q sont détaillés :

I.4.a. Transporteurs d'électrons et des protons dans la chaîne respiratoire mitochondriale :

La capacité du coenzyme Q de cycliser entre une forme oxydée et une forme réduite est utilisée dans la chaîne respiratoire, qui assure la production de la plupart de l'énergie utilisable par la cellule sous forme d'ATP (figure 3). Plus particulièrement, le coenzyme Q transfère des électrons des complexes I et II vers le complexe III dans la chaîne respiratoire située dans la membrane mitochondriale interne. Q est réduit par le complexe I (qui oxyde le NADH) ou par le complexe II (qui oxyde le succinate en fumarate) et est ensuite oxydé par le complexe III. Les électrons fournis par QH_2 permettent ensuite de réduire le cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux. Le trajet des électrons dans le complexe III n'a été résolu que quand un

trajet circulaire, appelé cycle Q, fût suggéré par Peter Mitchell puis détaillé entre autres par Bernard Trumpower (**Trumpower 1976**). L'ubiquinol est oxydé par une série de réactions au niveau de sites de liaisons Q_o et Q_i du complexe III. Ainsi, le cytochrome *c* est réduit puis se détache du complexe III. Le bilan de la réaction au niveau du complexe III est l'oxydation de deux ubiquinols QH_2 au site Q_o et la réduction d'une ubiquinone Q au site Q_i . Deux électrons sont transférés à deux molécules de cytochrome *c* et quatre protons sont transférés vers l'espace intermembranaire. La quinone oxydée retourne vers les complexes I ou II pour être à nouveau réduite. Le cytochrome *c* permet ensuite le transfert des électrons du complexe III vers le complexe IV. Le complexe IV permet le pompage de deux protons dans l'espace intermembranaire. Suite à la chaîne de complexes protéiques, le dernier accepteur d'électrons est le dioxygène qui sera ainsi réduit en formant deux molécules d'eau par 4 électrons et 4 protons. Les protons transloqués dans l'espace inter-membranaire (10 protons si NADH est oxydé ou 6 protons si succinate est oxydé) repasseront vers la matrice mitochondriale via une pompe à protons appelée ATP-synthase et qui est à l'origine de la formation d'ATP (figure 3).

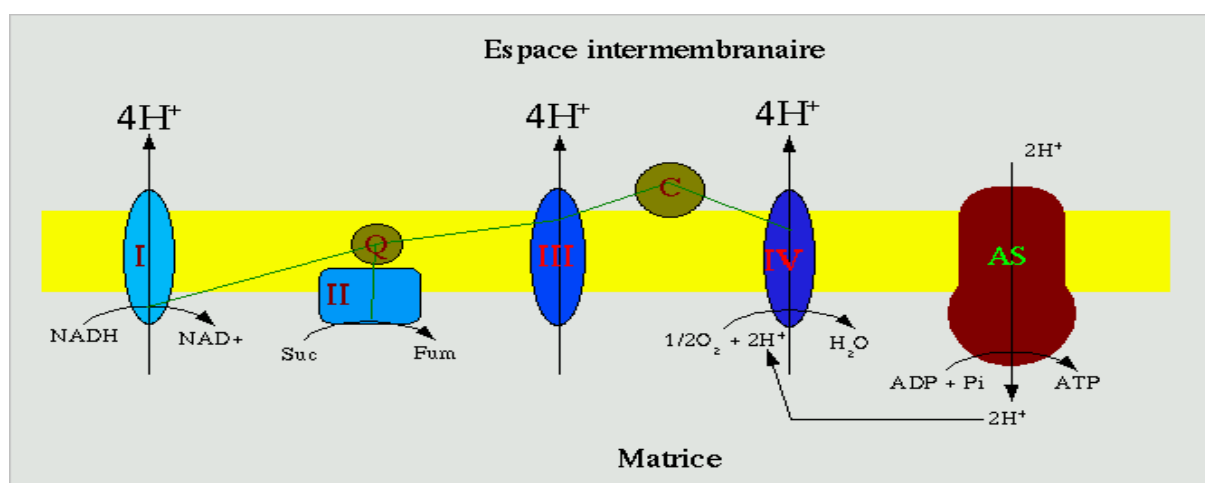


Figure 3 : Schéma de la chaîne respiratoire située dans la membrane mitochondriale interne : I: Complexe I, NADH-ubiquinone-oxydoréductase; II: Complexe II, succinate-ubiquinone-oxydoréductase; III: complexe III, ubiquinol-cytochrome *c* oxydoréductase; IV: Complexe IV, cytochrome *c* oxydase; AS: Complexe V, ATP synthase; Q: Coenzyme Q; C: Cytochrome *c*. L'entrée de deux ions H^+ assure la synthèse d'une molécule ATP à partir d'une molécule ADP et du phosphate inorganique Pi. Le trajet des électrons à travers la chaîne respiratoire est représenté en vert.

I.4.b. Anti-oxydant :

La forme réduite de Q (ubiquinol, QH_2) est un antioxydant liposoluble synthétisé *de novo* chez l'homme. Il fait partie, avec les tocophérols, les caroténoïdes et les oestrogènes, des lipides naturellement antioxydants. Lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire, une

réduction incomplète de la molécule de dioxygène peut se produire (notamment au niveau des complexes I et III) entraînant la production de ROS (reactive oxygen species) (**Papa et al. 1997**). Ces ROS sont des espèces chimiques oxygénées rendues très réactives du fait de la présence d'électrons de valence non appariés. Il peut s'agir par exemple du radical superoxyde O_2^- , de l'oxygène singulet 1O_2 , ou du radical hydroxyle OH^\bullet . Ces ROS formés dans la cellule sont capables d'attaquer les lipides, les protéines et l'ADN dans le cadre d'un processus intitulé « stress oxydant ».

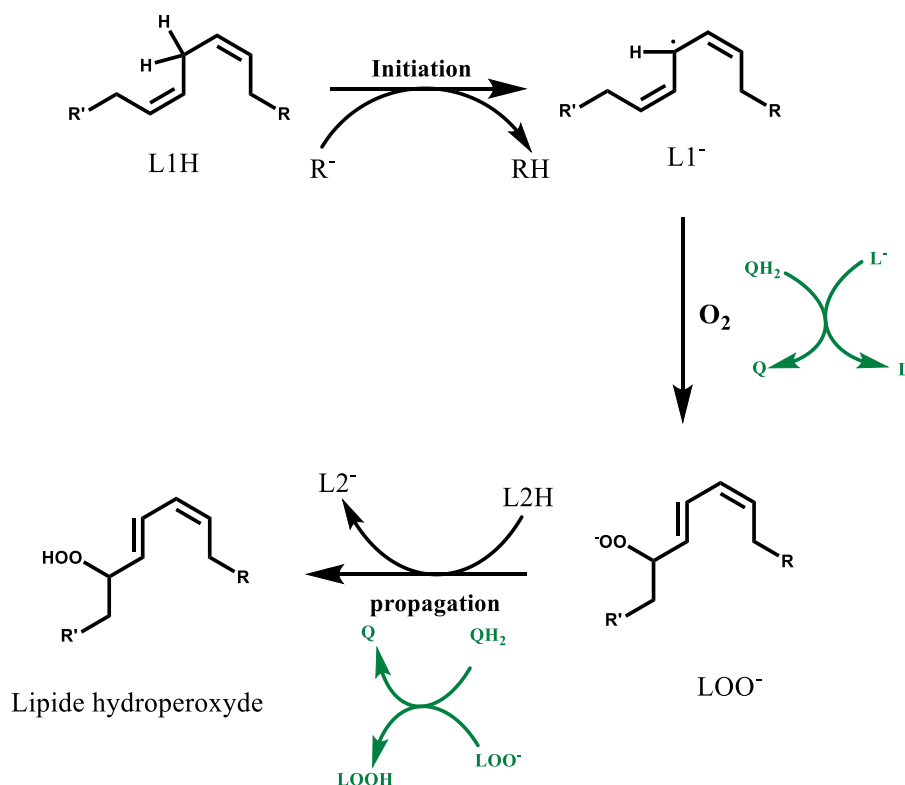


Figure 4: Sites d'action de QH_2 dans la peroxydation lipidique. QH_2 intervient dans les stades d'initiation et de propagation de la peroxydation lipidique.

La peroxydation lipidique est initiée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène du groupement méthylène d'un acide gras (figure 4) par les ROS (notamment O_2^- et H_2O_2) (**Turunen et al. 2004**). Ceci entraîne la formation d'un radical centré sur l'atome de carbone qui réagit avec le dioxygène pour former un radical peroxyde (LOO $^\bullet$) qui pourra à son tour arracher un atome d'hydrogène à une autre molécule pour aboutir à un lipide hydroperoxyde (figure 4). L'efficacité du coenzyme Q comme inhibiteur de la peroxydation lipidique provient du fait que QH_2 agit à différents niveaux du processus de peroxydation (initiation et propagation). Q peut s'oxyder pour empêcher la formation de LOO $^\bullet$ (**Turunen et al. 2004**) et aussi inhiber la propagation en éliminant directement LOO $^\bullet$ (**Turunen et al. 2004**).

QH₂ a aussi une action antioxydante sur les protéines membranaires en empêchant la propagation de l'oxydation protéique. Cette dernière se fait par oxydation directe des acides aminés et la propagation se fait au sein de la même protéine mais aussi vers d'autres protéines ou lipides (**Bentinger et al. 2007**).

QH₂ empêche aussi l'oxydation de bases d'ADN surtout dans le cas de l'ADN mitochondrial où ce dommage n'est pas facilement réparable (**Bentinger et al. 2007**).

I.4.c. Autres fonctions proposées du coenzyme Q :

En plus de son rôle connu en tant que transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale et d'antioxydant, plusieurs autres fonctions importantes du coenzyme Q ont été récemment décrites et sont requises pour un fonctionnement normal de la cellule :

1. La membrane plasmique de la plupart des cellules contient une NADH-oxydase Q-dépendante qui régule le rapport cytosolique NAD⁺/NADH et la réduction de l'ascorbate. Cette enzyme est impliquée dans la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire (**Gomez-Diaz et al. 1997**) et réduit donc Q au cours de son cycle catalytique.
2. L'ouverture des pores de transitions membranaires mitochondriaux permet la translocation de molécules de taille inférieure à 1500 Da, ce qui conduit à un effondrement des fonctions mitochondriales et peut initier l'apoptose. Le Coenzyme Q₁₀ est l'un des composés qui empêchent l'ouverture de ces pores (**Papucci et al. 2003**). De ce fait, il intervient contre les événements apoptotiques comme la déplétion en ATP, la libération du cytochrome *c* dans le cytosol, la dépolarisation de la membrane mitochondriale et la fragmentation de l'ADN.
3. Les protéines découplantes (notamment UCP1) présentes dans la membrane interne mitochondriale peuvent dissiper le gradient de protons de l'extérieur vers l'intérieur de cette membrane, découplant ainsi l'activité de la chaîne respiratoire de la phosphorylation oxydative et induisant en conséquence la production de chaleur (**Echtay et al. 2001**). Les protons sont pris en charge par les protéines découplantes et sont transférés à la forme oxydée du coenzyme Q, qui est donc un cofacteur essentiel du processus de thermogénèse, un phénomène commun dans les tissus adipeux bruns chez l'homme adulte (**Echtay et al. 2001**).

4. Le coenzyme Q exerce de multiples effets anti-inflammatoires en influençant l'expression de gènes dépendants du NFκB1 (**Schmelzer et al. 2007**). Des études *in-vitro* ont notamment montrées que le traitement de cellules intestinales par du coenzyme Q₁₀ induit l'expression des gènes codant pour les protéines suivantes : Interleukine 5, vitronectine, récepteur du vitronectine, thrombine et la protéine C-réactive (CRP). Tous ces gènes sont régulés par le facteur de transcription NFκB1 (**Schmelzer et al. 2007**).

5. Le coenzyme Q contribue aussi à lutter contre la dysfonction endothéliale en stimulant la libération endothéliale de l'oxyde nitrique et en inhibant la libération de l'endothélin-1 (ET-1). (**Hamilton et al. 2007**). Ceci pourrait être lié à l'activation de PPAR-α dans les cellules endothéliales.

I.4.d. Déficience de Coenzyme Q chez les eucaryotes

La déficience primaire en Coenzyme Q₁₀ est une affection autosomique récessive des gènes de biosynthèse de Q. Le spectre clinique englobe au moins cinq phénotypes majeurs: 1) encéphalomyopathie, caractérisée par la triade de la myoglobulinurie récurrente, l'implication du cerveau et fibres rouges déchiquetées; 2) une grave maladie infantile multisystémique; 3) ataxie cérébelleuse; 4) le syndrome de Leigh avec un retard de croissance, de l'ataxie et une surdité; 5) myopathie isolée (**Quinzii et al. 2010**). A cause de son rôle crucial dans la production d'énergie, les tissus qui demandent le plus d'énergie comme le rein et le cerveau semblent plus fortement affectés par une carence en coenzyme Q (**Bhagavan et al. 2005; Quinzii et al. 2014**). Dans la plupart des cas, la supplémentation en coenzyme Q₁₀ améliore l'état des patients.

La levure *S. cerevisiae* est un organisme qualifié d'aérobie facultatif qui peut donc croître soit par fermentation (indépendante de Q), soit par respiration. Ainsi, des mutants de levure déficients en coenzyme Q montrent une croissance normale sur milieu non respiratoire contenant du glucose comme source de carbone mais du fait de l'altération de la respiration, ces mutants sont incapables de pousser sur un milieu respiratoire contenant par exemple du lactate, du glycérol ou du succinate. Ce phénotype a permis d'identifier chez *S. cerevisiae*, la plupart des gènes de biosynthèse de Q. Les gènes humains ont ensuite été caractérisés par identité de séquence et complémentation fonctionnelle.

I.5. Les quinones bactériennes :

I.5.a. Distribution phylogénétique des quinones bactériennes

L'énergie disponible au sein d'une cellule qui respire est le résultat de transfert des électrons à travers une chaîne respiratoire à partir d'un substrat réducteur vers un substrat oxydant. Le transfert des électrons est accompagné d'un transfert des protons. A l'exception de certains types d'acétogénèse et de méthanogénèse, toutes les chaînes bioénergétiques utilisent des médiateurs redox pour assurer la connexion entre les complexes respiratoires (**Schoepp-Cothenet *et al.* 2013**).

La figure 5 montre que la ménaquinone (MK) ayant un potentiel rédox bas ($E = -74$ mV) est la seule quinone présente chez l'ancêtre commun (LUCA). Le GOE (Great Oxidation Event) a entraîné l'apparition du dioxygène il y a environ 2,3 milliards d'années. Ceci a causé l'oxydation des milieux et a modifié la composition des chaînes bioénergétiques et par conséquent la composition en quinones a changé depuis le GOE.

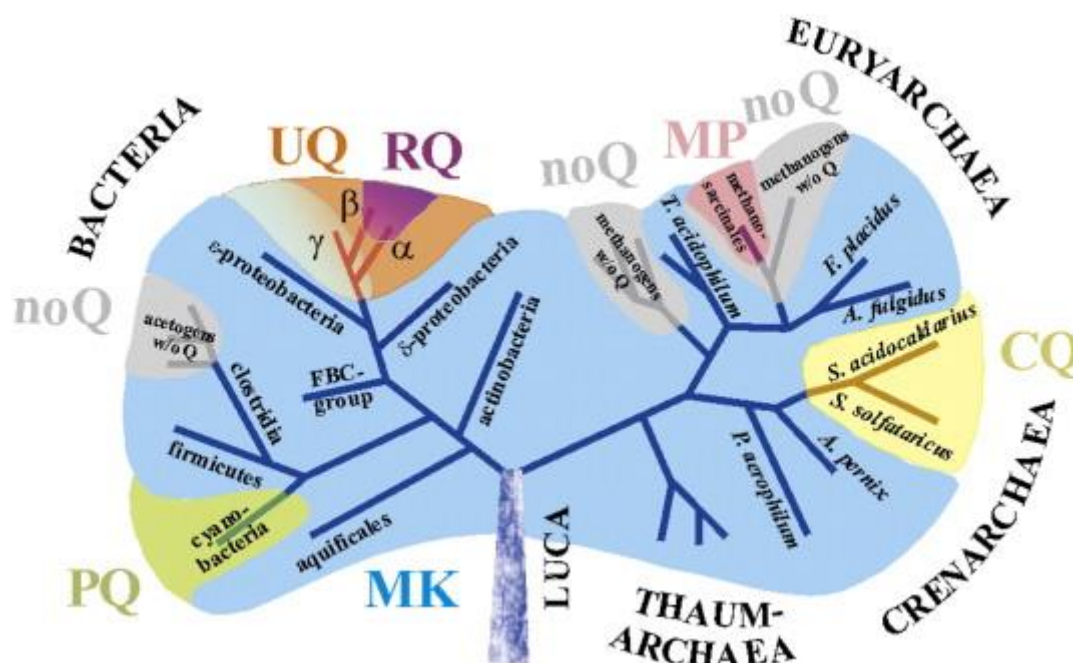


Figure 5: Schéma simplifiée de l'arbre phylogénétique représentant les différents types de quinones et méthano-phénazine chez les procaryotes. Cet arbre a été établi en se basant sur des études biochimiques publiées sur ces espèces. L'ancêtre commun (LUCA pour Last Universal Common Ancestor) possède uniquement de la ménaquinone (MK). L'émergence des autres quinones se fait lors du passage à une atmosphère oxygénée. Les différents types de médiateurs rédox présentes chez les procaryotes sont marqués par des couleurs différentes : ubiquinone en orange, rhodoquinone en violet, plastoquinone en vert, caldariellaquinone en jaune et méthano-phénazine en rose. D'après (Schoepp-Cothenet *et al.* 2013).

L'émergence des autres quinones (ou des transporteurs des électrons liposolubles) à potentiels rédox hauts et bas se fait dans 4 parties différentes de l'arbre phylogénétique. 1) Les

microorganismes les plus récents comme les protéobactéries de type α , β et γ contiennent de l'ubiquinone UQ. Alors que les protéobactéries de type γ sont toujours capables de biosynthétiser des MK, certaines protéobactéries de types α et β ont perdu la capacité de biosynthétiser les ménaquinones et contiennent plutôt de la rhodoquinone (RQ) (marquée en violet, figure 5). La biosynthèse de RQ (dont le potentiel rédox est bas ($E'_0 = -63$ mV)) chez ces microorganismes pourrait compenser la perte de MK pour assurer la colonisation des habitats anaérobies. 2) Les cyanobactéries ne possèdent ni Q ni MK mais plutôt de la plastoquinone PQ qui sont largement répandues chez les plantes (marquée en vert, figure 5). 3) Les méthanosarcinales contiennent de la méthanophénazine (marquée en rose, figure 5) et finalement 4) la caldariellaquinone (CQ) se trouve chez les sulfobactéries (marquée en jaune, figure 5) (Schoepp-Cothenet *et al.* 2013). La CQ ($E'_0 = 100$ mV à pH=6,5 selon (Anemuller *et al.* 1990)) possède un potentiel rédox plus haut que la MK et elle est donc supposée d'apparaître après la MK durant l'évolution pour assurer l'adaptation aux conditions aérobies (Nowicka and Kruk 2010).

Escherichia coli (*E. coli*), notre modèle d'étude, fait partie de la famille de protéobactéries de type γ . *E. coli* contient 3 quinones : le coenzyme Q ou l'ubiquinone (Q), la diméthylménaquinone (DMK) et la ménaquinone (MK).

La structure de différentes quinones présentes chez *E. coli* est illustrée dans la figure 6 :

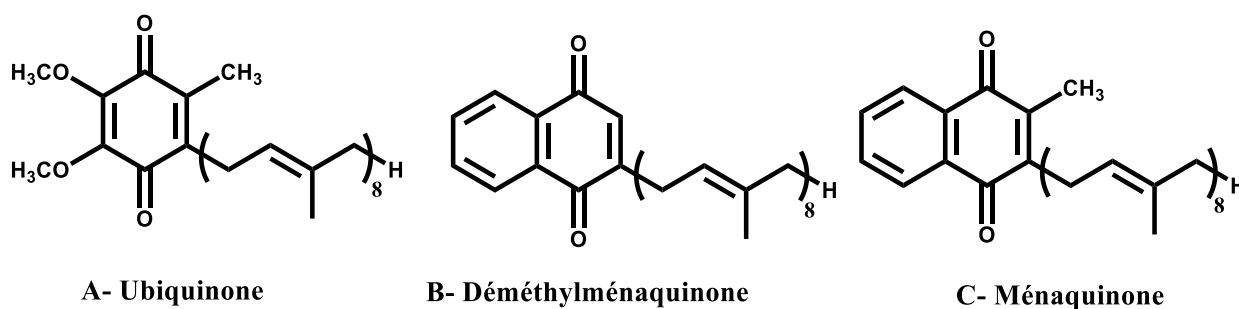


Figure 6: Structures de quinones majoritaires présentes chez *E. coli*. Toutes les quinones majoritaires présentes chez *E. coli* ont une chaîne octaprényle. Des quantités minoritaires de Q₁, Q₇, DMK₇, MK₆, MK₇ et MK₉ peuvent aussi être présentes (Collins and Jones 1981).

La proportion de ces quinones dépend de la présence (aérobiose) ou pas (anaérobiose) d'oxygène dans le milieu de culture. En fait, l'ubiquinone est majoritaire dans les conditions aérobies alors que les naphthoquinones prédominent dans les conditions anaérobies (Alexander *et al.* 1978a; Shestopalov *et al.* 1997).

I.5.b. Rôles des quinones chez la bactérie *E. coli* :

I.5.b.1. Transporteurs d'électrons dans la chaîne respiratoire :

Contrairement aux eucaryotes dont la chaîne respiratoire ne réduit que le dioxygène, *E. coli* possède une multitude de chaînes respiratoires lui permettant d'utiliser une grande diversité d'accepteurs terminaux d'électrons tels que l'oxygène, le nitrate, le nitrite, le fumarate, le DMSO (diméthyl sulfoxyde)... (figure 7). Ces accepteurs ont des potentiel rédox différents (le nitrate ($E'_0=430$ mV) ; le DMSO ($E'_0=140$ mV) ; le fumarate ($E'_0=30$ mV)) et la réduction de certains est préférentiellement effectuée par un type de quinone (voir partie II). Globalement, les trois quinones d'*E. coli* sont utilisées dans les chaînes respiratoires (figure 7).

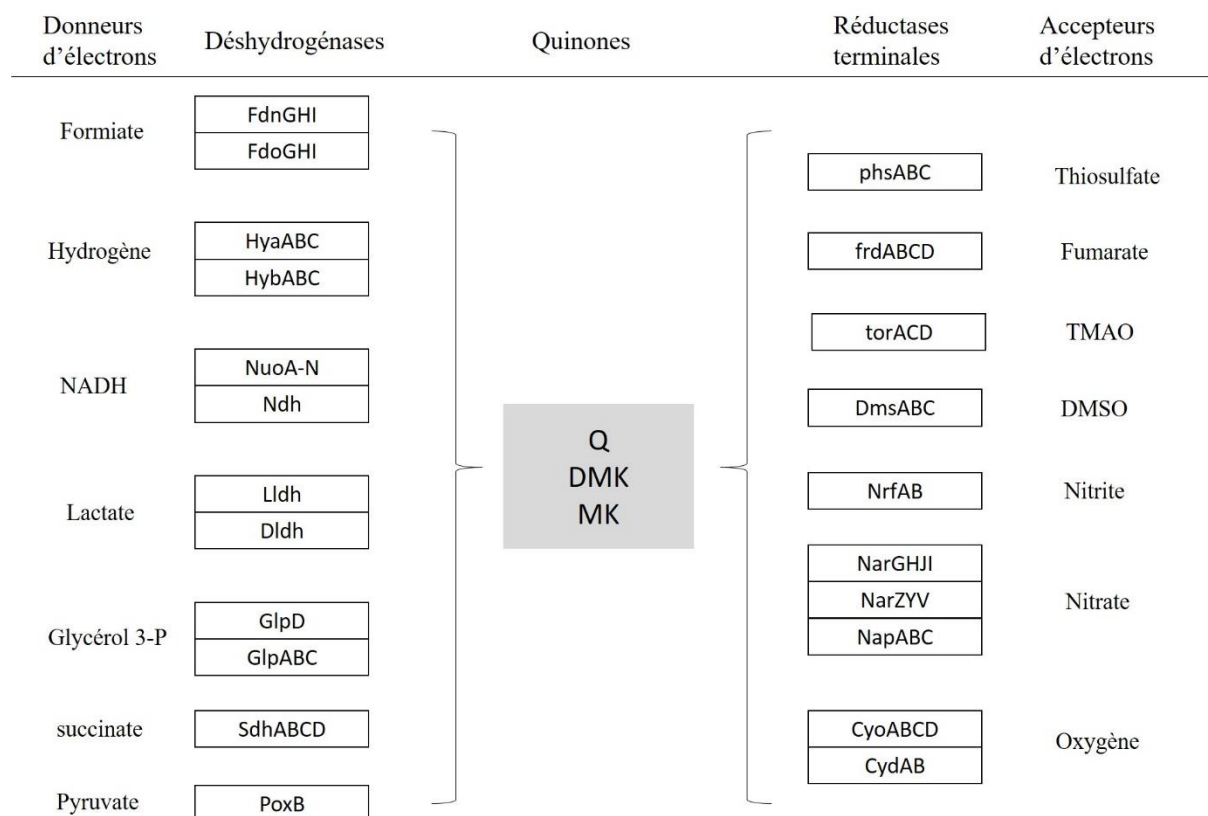


Figure 7: Modularité des chaînes respiratoires d'*E. coli* : Les électrons passent respectivement du donneur, aux déshydrogénases, aux quinones jusqu'à l'accepteur final via les réductases terminales qui varient en fonction des respirations.

Fdn : formate déshydrogénase N et O ; Hya et Hyb : Hydrogénase 1 et 2 ; Nuo et Ndh : NADH déshydrogénase I et II ; LIDH et DIDH : L et D- lactate déshydrogénase ; GlpD et GlpABC : Glycérol - 3- phosphate déshydrogénase (aérobie et anaérobie respectivement) ; Sdh : succinate déshydrogénase ; Pox : Pyruvate oxydase ; Phs : Thiosulfate réductase ; Frd : fumarate réductase ; Dms : DMSO réductase ; Tor : TMAO réductase ; Nrf : Nitrite réductase formate dépendante ; Nar : nitrate réductase ; cyo, cyd : oxygène réductase. Adapté de (Uندن and Bongaerts 1997).

Les quinones sont réduites par les électrons provenant de l'oxydation du donneur d'électrons par les déshydrogénases. A la différence de la chaîne respiratoire chez les eucaryotes, les chaînes respiratoires d'*E. coli* ne possèdent pas de cytochrome *c*. Les réductases terminales sont réduites directement par les électrons transférés depuis le pool de quinones. Les chaînes respiratoires aérobies et anaérobies ainsi que le type de quinones utilisées dans chaque chaîne seront décrits dans la partie II.

1.5.b.2. Formation des ponts disulfures :

La formation de ponts disulfures est un processus de maturation de protéines nouvellement formées faisant intervenir les protéines DsbA et DsbB. Ces deux protéines font partie de la famille des thiol-disulfide oxidoréductases. DsbA est une protéine périplasmique contenant un pont disulfure instable qui se réduit lors de la formation d'un pont disulfure dans une protéine cible. Les cystéines Cys30 et Cys33 de DsbA sont ensuite réoxydées par DsbB, une protéine membranaire dans laquelle le pont disulfure formé par la paire de cystéines Cys104-Cys130 est réduit et avant d'être réoxydé par le pont disulfure Cys41-Cys44 qui est réduit à son tour (figure 8). Il a été démontré que le coenzyme Q interagit directement avec DsbB et est réduit en QH₂ afin de reformer le pont disulfure Cys41-Cys44 dans DsbB (**Bader et al. 2000**). Le transfert de ponts disulfures dépendants de DsbA/DsbB est toujours fonctionnel en conditions anaérobies où les naphthoquinones sont les quinones majoritaires et également dans un mutant *Δubi*, suggérant un rôle fonctionnel des naphthoquinones. Takahashi et al. (**Takahashi et al. 2004**) ont purifié DsbB à partir d'une souche *Δubi* qui contient uniquement les naphthoquinones. L'analyse de cette préparation par HPLC couplé à un spectromètre de masse montre un seul pic correspondant à la masse *m/z* de DsbB+MK₈ démontrant ainsi que DsbB interagit avec la MK₈. L'importance des quinones pour la fonction de DsbA/DsbB est révélée par l'observation que l'oxydation de DsbA par DsbB est altérée dans le double mutant *ΔubiΔ Δ menA* qui ne biosynthétise ni Q, ni MK (**Kobayashi et al. 1997**). La réoxydation des quinones réduites par le système DsbA/DsbB se fait par les réductases terminales de la chaîne respiratoire (figure 8).

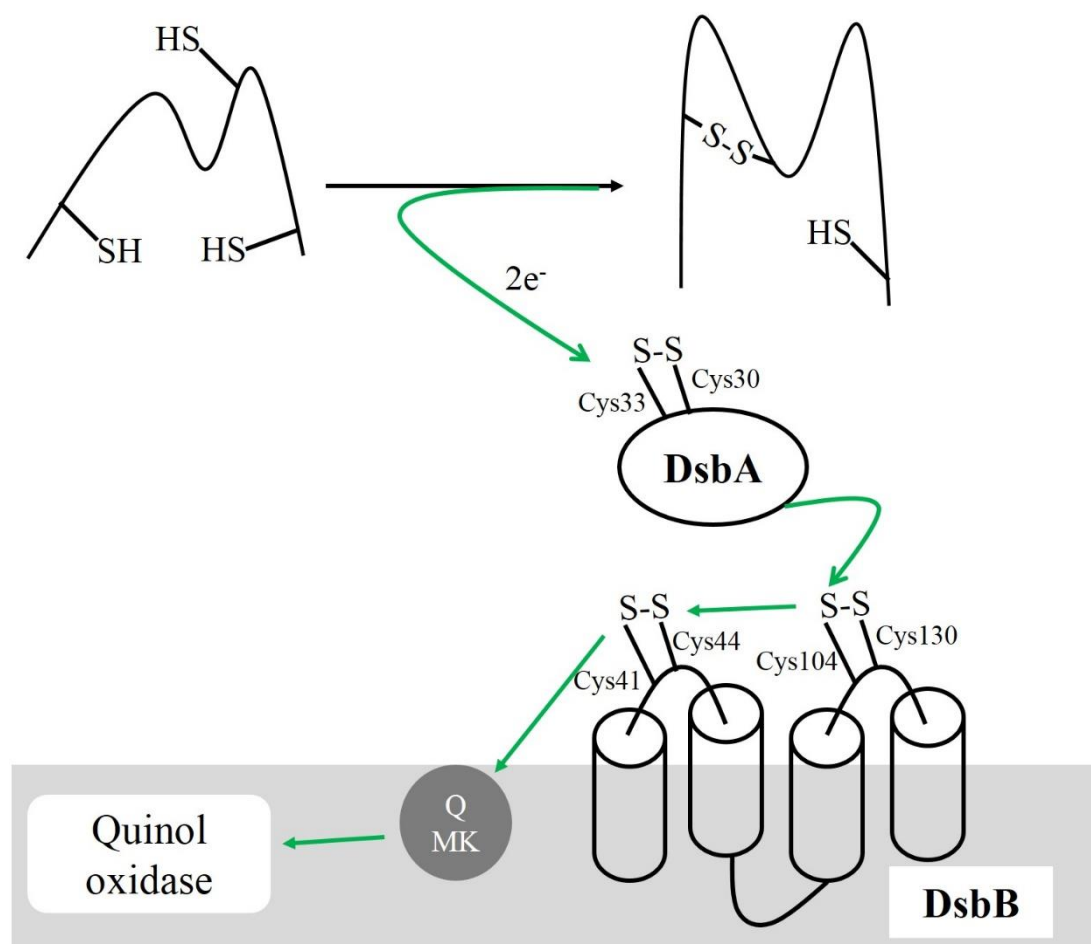


Figure 8: Implication des quinones dans la voie oxydative DsbA-DsbB : Un pont disulfure est inséré par DsbA dans la protéine cible. Les électrons extraits sont transférés de DsbA à DsbB puis au pool de quinones. Les électrons sont ensuite transférés par la chaîne respiratoire à l'accepteur terminal. Les flèches en vert représentent le transfert des électrons. Adapté de (Naoko Fujimoto *et al.* 2012).

1.5.b.3. Rôle de Q_8 dans la protection contre le stress osmotique :

Sevin et Sauer ont proposé en 2014 que Q_8 joue un rôle dans la protection d'*E. coli* contre le stress osmotique (Sevin *et al.* 2014). En effet, ces auteurs ont remarqué que le taux des intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone et les terpénoides sont 100 fois plus élevés en exposant une souche WT (BW25113) à un stress osmotique (concentration de NaCl= 500 mM) en comparant à la condition contrôle (sans NaCl). De plus, par spectrométrie de masse, ils ont remarqué que tous les intermédiaires de biosynthèse de Q_8 sont accumulés environ 40 fois lors d'un stress osmotique et le produit final (Q_8) est accumulé 250 fois à une concentration élevée de NaCl en comparaison à la condition sans NaCl.

En cultivant une souche $\Delta ubiG$ (qui ne produit pas de Q_8) en présence de différentes concentrations de NaCl, la tolérance de cette souche mutante au stress osmotique est inférieure

à celles des souches qui ne sont pas capables de biosynthétiser le tréhalose (un composé osmoprotecteur) suggérant un rôle osmoprotecteur de Q₈. Ce rôle osmoprotecteur a été testé *in vitro* en incubant des liposomes artificiels en présence de différentes concentrations de NaCl et en présence ou non de Q₁₀. En effet, la présence de Q₁₀ a protégé les liposomes même à 1 M de NaCl alors que l'absence de Q₁₀ entraîne une destruction des liposomes à 300 mM de NaCl (Sevin and Sauer 2014). L'ensemble de ces résultats a permis aux auteurs de proposer que l'ubiquinone accumulé assure cette osmoprotection par augmentation de l'épaisseur de la membrane bactérienne.

Au laboratoire, nous nous sommes étonnés de la très grande accumulation des intermédiaires de biosynthèse et du produit final, Q₈, lors d'un stress osmotique. Nous avons répété cette expérience et nous avons obtenu des résultats différents. En fait, j'ai cultivé la souche BW25113 dans les mêmes conditions de culture en présence d'une gamme de NaCl. Le contenu en Q₈ augmente de 1,5 fois en présence de 1M de NaCl en comparant avec 0 mM de NaCl. Catherine Clarke (UCLA) a obtenu des résultats comparables et, à ce jour, nous ne pensons pas que la culture d'*E. coli* dans des conditions de stress osmotique entraîne une forte accumulation de Q₈ contrairement à ce qui a été décrit par Sauer et Sévin.

II. Les différents systèmes respiratoires chez *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie Gram négative, anaérobie facultative qui est capable d'adapter son métabolisme en fonction des conditions environnementales. On distingue deux types de métabolisme chez cette bactérie :

- La respiration qui peut être soit aérobique, soit anaérobie selon la nature de l'accepteur final d'électrons (O₂, TMAO, DMSO, ...) (figure 7).
- La fermentation qui est utilisée par *E. coli* en absence de tout accepteur d'électrons.

II.1. La fermentation chez *E. coli* :

Lors de la fermentation, la production d'énergie sous forme d'ATP repose sur une phosphorylation liée au substrat (substrate level phosphorylation). La fermentation est utilisée

par la bactérie en absence totale d'accepteurs d'électrons. Elle permet de produire de l'ATP à partir de substrats carbonés tels que le glucose (figure 9A).

La conversion de glucose en pyruvate nécessite de la NAD^+ et entraîne la formation de NADH qui sera réoxydé par transfert d'électrons et des protons sur un accepteur terminal dérivant du pyruvate ou le pyruvate lui-même. Par exemple, la formation du lactate à partir du pyruvate est accompagnée de réoxydation de NADH en NAD^+ . NAD^+ sera réutilisé pour la conversion d'une nouvelle molécule de glucose et le cycle de fermentation recommence (figure 9B). Outre le lactate, les produits de fermentation formés peuvent être des acides organiques, des alcools ou des gaz (figure 9A). Ces produits s'accumulent dans le milieu de culture. Au cours de cette chaîne d'oxydation, une liaison phosphate est créée sur l'un des intermédiaires puis transférée à l'ADP.

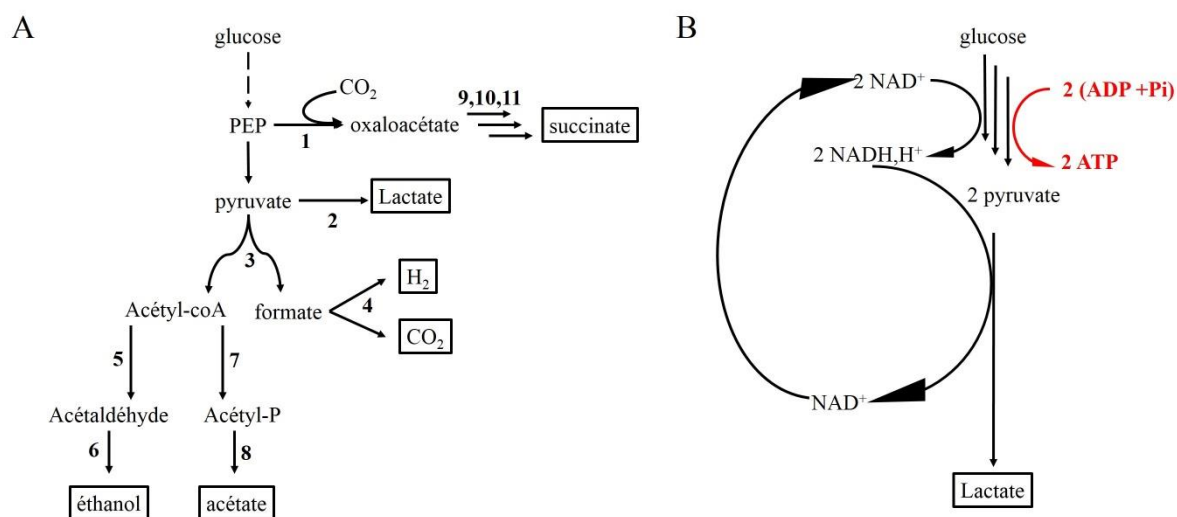


Figure 9: Flux de carbone pendant la fermentation : A) Les réactions de fermentation, indiqués par les flèches noires solides se déroulent en absence des accepteurs des électrons. Les produits finaux issus de la dégradation du glucose sont encadrés. B) Exemple de la fermentation lactique : NAD^+ est nécessaire pour la transformation de pyruvate à partir du glucose. NADH est utilisé pour la fermentation lactique puis un recyclage de la molécule de NADH se fait pour son utilisation dans un nouveau cycle de fermentation. Les noms des enzymes sont les suivants : 1) PEP carboxylase ; 2) Lactate déshydrogénase ; 3) Pyruvate formate lyase ; 4) Formate hydrogène lyase ; 5) acétaldéhyde déshydrogénase ; 6) Alcool déshydrogénase ; 7) Phosphotransacétylase ; 8) Acétate kinase ; 9) Malate déshydrogénase ; 10) Fumarate B ; 11) fumarate réductase. D'après (Gunsalus *et al.* 1994).

La fermentation a un rendement énergétique faible puisque l'oxydation du substrat organique du départ est incomplète. En passant par la fermentation, 2 à 3 moles d'ATP sont produites à partir d'une mole de glucose. *E. coli* a donc tendance à favoriser la respiration plutôt que la fermentation dès qu'un accepteur terminal d'électron est disponible dans le milieu.

II.2. La respiration chez *E. coli* :

Les chaînes respiratoires aérobie ou anaérobie contiennent trois composants majeurs :

- Les déshydrogénases primaires dont le rôle est d'oxyder un substrat spécifique (comme le NADH ou le succinate...) et de transférer les électrons à un pool de quinones disponibles.
- Les quinones qui servent d'intermédiaires dans le transport des électrons et des protons entre les déshydrogénases primaires et les oxydoréductases terminales. Comme décrit en I.5.a. *E. coli* possède 3 types de quinones : Q₈, DMK₈ et MK₈ (figure 6).
- Les oxydoréductases terminales chargées de la réduction d'un accepteur final exogène des électrons (comme l'oxygène) par oxydation des quinones.

II.2.a. Les déshydrogénases :

La chaîne respiratoire d'*E. coli* comprend 12 déshydrogénases primaires (figure 7). Les déshydrogénases sont chargées d'oxyder un substrat spécifique disponible comme le NADH, le succinate, le lactate, l'hydrogène... et de transférer les électrons à un pool de quinones. Ces enzymes diffèrent entre elles par l'orientation du site actif vers le périplasma ou le cytoplasme et la présence des domaines hydrophiles, hydrophobes et d'hélices transmembranaires. Sur la base de ces critères, on peut classer les déshydrogénases en deux groupes (**Uden and Bongaerts 1997**) :

- Le groupe I qui contient à la fois des sous-unités hydrophobes et des sous-unités hydrophiles. Ce groupe contient la NADH déshydrogénase 1, les hydrogénases (HyaABC, HybABC), la glycérol-3-Phosphate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase et la formate déshydrogénase (FdoGHI, FdnGHI). Le site actif qui lie les substrats est localisée dans les sous-unités hydrophiles. Les sous-unités hydrophobes servent d'ancrage à la membrane aux unités hydrophiles. Parmi ces enzymes, la NADH déshydrogénase I est la seule enzyme capable de transloquer 2 protons à travers la membrane.

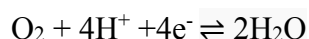
La succinate déshydrogénase a un rôle particulier car, outre son rôle dans le transfert des électrons à travers la chaîne respiratoire, il est aussi membre du cycle TCA et joue donc un rôle dans la connexion de ces deux voies énergétiques.

- Le groupe II regroupe les enzymes formées d'une seule protéine hydrophile. Ces protéines sont périphériques à la membrane du côté cytoplasmique. Dans ce groupe, on trouve la lactate déshydrogénase, la pyruvate déshydrogénase et la NADH déshydrogénase II. La liaison avec la membrane pourrait être requise pour la donation des électrons aux quinones (**Uden and Bongaerts 1997**). Les enzymes de ce groupe ne permettent pas la translocation de protons à travers la membrane

Toutes les déshydrogénases à l'exception de la succinate déshydrogénase sont capables d'utiliser n'importe laquelle des trois quinones d'*E. coli* notamment car les potentiels rédox de ces quinones conviennent à toutes ces enzymes (**Tran et al. 1997**). La succinate déshydrogénase transfère les électrons uniquement à Q (**Wallace et al. 1977b; Calhoun et al. 1993**). Toutefois, les sites de réduction des quinones ne sont pas caractérisés.

II.2.b. La chaîne respiratoire aérobie chez *E. coli* :

Dans la respiration aérobie, l'accepteur final d'électrons est le dioxygène, O₂. Cette molécule possède des propriétés qui lui confèrent le statut d'oxydant idéal pour la respiration. En effet l'O₂ est le plus favorable énergétiquement du fait de son haut potentiel rédox (E= 820 mV) et de sa capacité à diffuser rapidement à travers les membranes. *E. coli* possède trois réductases capables d'oxyder les quinones et de réduire l'oxygène : les quinols *bo*, *bdI* et *bdII* oxydases. La présence de ces différentes quinol oxydases terminales permet à *E. coli* d'optimiser la respiration aérobie en fonction des différentes concentrations d'oxygène présentes dans le milieu. En effet, ces quinols oxydases diffèrent par leur affinité pour l'oxygène : la quinol *bo* oxydase possède une faible affinité pour l'oxygène (K_M = 0,05-0,2 µM) et est principalement exprimée à une pression d'oxygène élevée, par contre les quinols *bdI* et *bdII* oxydase possèdent une affinité élevée pour l'oxygène (K_M = 3-8 nM) et sont surtout exprimées dans des conditions microaérophiles (**D'Mello et al. 1995, 1996**). Ces 3 enzymes permettent de réduire l'oxygène en eau suivant la réaction suivante :



II.2.b.1. Quinol *bo*₃ ubiquinol oxydase :

La quinol *bo* oxydase est un complexe formé de 4 sous-unités I, II, III et IV codées par l'opéron *cyoABCD*. CyoB (sous-unité I) constitue le site actif de l'enzyme, contenant l'hème *b* et le centre binucléaire regroupant l'hème *o₃* et le Cu_B. Un modèle d'oxydation de l'ubiquinol (modèle de double site de liaison de Q - figure 10) a été proposé par Yap et ses collaborateurs en 2010 (**Yap et al. 2010**). Ce modèle propose deux sites de liaisons à l'ubiquinone nommés Q_H et Q_L et l'ubiquinone oxydée fixée au site Q_H agirait comme cofacteur en assurant le transfert des électrons (un par un) du substrat (ubiquinol) fixé au site Q_L vers l'hème *b*. Ce dernier transfère les électrons au centre binucléaire hème *o₃-Cu_B* qui lie l'oxygène et assure sa réduction en H₂O grâce à 4 électrons et 4 protons. Le transfert des 4 électrons s'accompagne d'une translocation de 4 protons à travers la membrane.

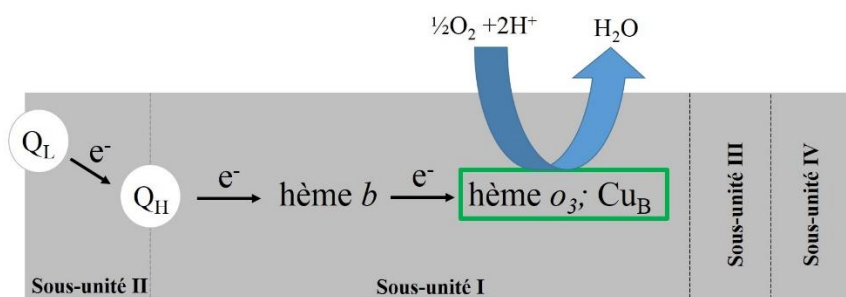


Figure 10: Transfert des électrons dans la quinol *bo₃* oxydase. Adapté de (**Yap et al. 2010**).

II.2.b.2. Quinol *bdI* ubiquinol oxydase :

Le complexe quinol-*bdI* oxydase est formé de trois sous-unités CydA, CydB et CydX codés par l'opéron *cydAB*. Ce complexe contient 3 hèmes : L'hème *b₅₅₈* localisé dans la sous-unité CydA et les hèmes *b₅₉₅* et *d* localisés à l'interface des 2 sous-unités. Ces deux derniers forment un dihème qui lie l'oxygène. L'oxydation de l'ubiquinol se fait quand QH₂ cède ses 2 électrons 1 par 1 à l'hème *b₅₅₈* qui les transfère au dihème (*b₅₉₅-d*). Ce dernier, réduit l'oxygène en H₂O (**Junemann 1997**). Le quinol *bdI* oxydase ne permet pas de translocation des protons à travers les membranes.

II.2.b.3. Quinol *bdII* ubiquinol oxydase :

Le complexe quinol *bdII* oxydase est formé de 2 sous-unités AppB et AppC codées par l'opéron *appBC*. Des études structurales ont montré que les 2 complexes Cyt-*bdI* oxydase et

Cyt-*bdII* oxydase ont une grande similarité de structure (**Dassa et al. 1991**). Ce complexe, tout comme le complexe Cyt-*bdI* ubiquinol oxydase est induit dans les conditions microaérophiles et ne permet pas de translocation des protons à travers la membrane.

II.2.b.4. Utilisation des quinones par les quinols oxydases :

Q est la quinone préférée pour les quinols oxydases puisque des mutants Δubi (pas de biosynthèse de Q) montrent une forte diminution de la respiration aérobie. Récemment des études ont proposé l'implication des ménaquinones dans la réduction des cytochromes. En 2012, Sharma *et al.* ont proposé que la DMKH₂ (déméthylménaquinol) peut transférer des électrons aux quinols oxydases (**Sharma et al. 2012**) sur la base qu'une souche $\Delta ubiE$ (déficiente en Q₈ et MK₈ et accumulant la DMK₈) maintient une respiration aérobie à 8% par rapport à une souche WT suggérant que le DMKH₂ peut fonctionner en aérobiose. De plus, en utilisant différentes souches contenant un seul type de quinol oxydase ($\Delta ubiE$ avec soit Cyt-*bo*₃, soit Cyt-*bdI*, soit Cyt-*bdII* uniquement), la consommation d'oxygène est maintenue partiellement suggérant que le DMKH₂ peut donner les électrons aux 3 types de quinol oxydases. Cependant, ces auteurs négligent l'intermédiaire de biosynthèse de Q₈ qui s'accumule dans la souche $\Delta ubiE$, la déméthylménaquinone (DDMQ₈, voir figure 12, composé 6) et qui pourrait transférer des électrons aux quinols oxydases. En effet, Wallace et Young ont démontré qu'un intermédiaire de biosynthèse de Q₈, le DMQ₈ (composé 7, figure 12) accumulé dans la souche $\Delta ubiF$ joue un rôle dans la respiration (**Wallace et al. 1977a**). De plus, récemment une manipulation métabolique de la chaîne respiratoire de la souche $\Delta ubiE$ a été effectuée par Wu *et al.* (**Wu et al. 2015**). Ces auteurs ont démontré que la respiration est maintenue partiellement dans cette souche en accord avec les travaux de Sharma *et al.*. Cependant, le fait d'induire une compétition dans la biosynthèse des précurseurs de Q₈ cause l'arrêt de biosynthèse de DDMQ₈ alors que l'accumulation de DMK₈ est maintenue et entraîne l'abolition de la respiration aérobie. Il semble donc que la respiration aérobie observée dans la souche $\Delta ubiE$ est liée à la présence de DDMQ₈ et non à celle de DMKH₂. En conclusion, la suggestion que DMKH₂ est capable de donner des électrons aux quinols oxydases proposée par Sharma *et al.* n'est pas validée et l'étude d'une souche $\Delta ubiE\Delta menA$ (accumulant le DDMQ₈ uniquement) pourrait permettre de clarifier définitivement la controverse.

La ménaquinole (MK₈H₂) peut aussi participer à la respiration via la quinols *bdI* oxydase. L'intestin des vertébrés constitue un milieu favorable pour la colonisation d'une large population de bactéries anaérobies facultatives dont *E. coli*. Afin de déterminer la quinone contribuant à la respiration bactérienne à l'intérieur de l'intestin, Jones *et al.* ont utilisé trois souches : *ubiCA* (contenant DMK et MK), *menA* (contenant Q uniquement) et *ubiE* (contenant DDMQ (composé 6, figure 12) uniquement) (Jones *et al.* 2011). Alors que les souches *ubiCA* et *menA* sont toujours capables de coloniser l'intestin, la souche *ubiE* ne l'est pas. Ces résultats indiquent qu'outre le Q₈, la MK₈ est requise pour une colonisation efficace. Des études complémentaires effectuées par ces mêmes auteurs sur des souches mutantes des différentes réductases terminales ont montré que la MK₈ est capable de transférer les électrons à la quinol *bdI* oxydase. Il a également été montré par RPE (Résonance Paramagnétique électronique) que l'enzyme quinol *bdI* oxydase purifiée est capable de stabiliser une forme ménasemiquinone qui est très instable en solution (Hastings *et al.* 1998).

II.2.c. La chaîne respiratoire anaérobie chez *E. coli* :

Dans la respiration anaérobie, ce sont des accepteurs d'électrons autres que le dioxygène qui sont utilisés. Cette respiration est moins efficace énergétiquement que la respiration aérobie mais néanmoins elle est plus favorable que la fermentation. La diminution du rendement en ATP provient du fait que les accepteurs d'électrons ont des potentiels rédox moins positifs que l'oxygène. *E. coli* peut utiliser le nitrate, le nitrite, le fumarate, le TMAO et le DMSO comme accepteurs finaux d'électrons alternatifs à l'oxygène (voir figure 7).

Quand le nitrate est l'accepteur final d'électrons, *E. coli* est capable de respirer en le réduisant en nitrite. S'il est présent dans le milieu, le nitrate est le plus favorable sur le plan énergétique (E=430 mV) et inhibe l'expression des autres chaînes anaérobies. Il existe deux enzymes nitrate réductases membranaires NarA (codée par *narGHI*) et NarZ (codée par *narZYWV*) et une nitrate périplasmique NapA (codée par *napABC*). Ces 3 enzymes sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons quelle que soit la phase de croissance (NarA en phase exponentielle et NarZ en phase stationnaire) mais aussi quelle que soit la quantité de nitrate disponible (NarA en forte concentration et NapA en faible concentration) (Bonnefoy *et al.* 1994; Potter *et al.* 1999). Ceci démontre l'adaptabilité d'*E. coli* aux conditions de croissance.

NarGHI est une enzyme hétérotrimérique dans laquelle le site d'oxydation des quinones est localisé dans la sous-unité NarI (site Q_D). Wissenbach *et al.* ont démontré que la nitrate

réductase NarA oxyde l'ubiquinol (QH₂) et le ménaquinol (MKH₂) mais pas le diméthylménaquinol (DMKH₂) (Wissenbach *et al.* 1990). Cependant, une étude a récemment montré que la DMKH₂ peut aussi participer à la respiration via la nitrate réductase NarA. En effet, une souche ne synthétisant que la DMK₈ est capable de pousser sur milieu respiratoire glycérol-nitrate aussi efficacement qu'une souche produisant toutes les quinones (Rendon *et al.* 2015). Des études spectroscopiques par RPE ont montré que NarGHI est capable de stabiliser une forme semiquinone qui est autrement très instable en solution. La forme semiquinone a été observée pour les 3 quinones et est stabilisée par une liaison hydrogène avec l'histidine His66 du site Q_D qui est perdue lorsque His66 est mutée en tyrosine (Rendon *et al.* 2015; Arias-Cartin *et al.* 2010).

Les fumarate réductase, DMSO réductase et TMAO réductase ne peuvent pas utiliser l'ubiquinol comme donneur d'électrons puisque son potentiel rédox est trop électropositif. Par contre ces 3 réductases sont capables d'utiliser le DMKH₂ et le MKH₂ comme donneurs d'électrons (Sharma *et al.* 2012; Wissenbach *et al.* 1990)

II.3. Contrôle de l'expression des enzymes respiratoires

L'expression des différentes chaînes respiratoires est principalement soumise au contrôle de l'accepteur terminal d'électrons présent dans le milieu. Les principaux systèmes de régulation par l'oxygène sont : la Fumarate Nitrate Réductase (FNR) qui effectue une réaction directe avec le dioxygène et le système régulateur à deux composants Arc A / Arc B (Aerobic respiratory control with 2 compounds A and B) par détection indirecte de la présence d'oxygène à travers les constituants de la chaîne respiratoire (Unden and Schirawski 1997).

II.3.a. Système Arc

Le système Arc est un système membranaire à 2 composants. Ce type de système existe chez les bactéries mais aussi chez les eucaryotes inférieurs comme *S. cerevisiae* et les plantes mais n'existe pas chez les mammifères (Song *et al.* 1999). Le premier composant **ArcB** sert comme détecteur (senseur) qui va s'autophosphoryler en présence d'ATP en réponse à un signal environnemental. Le groupement phosphate va ensuite être transféré au 2^{ème} composant **ArcA** qui

sous sa forme active (forme phosphorylée) va se comporter comme un régulateur de transcription.

ArcA est formé de deux domaines : un domaine N-terminal qui reçoit le signal et un domaine C-terminal effecteur contenant un motif HTH (Hélice-Tour-Hélice) de liaison à l'ADN. La liaison d'ArcA aux promoteurs de certains gènes cibles a été étudiée par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) (**Drapal *et al.* 1995; Lynch *et al.* 1996**). Ces études consistent à incuber la forme purifiée d'ArcA en présence ou pas du carbamoyl phosphate et à évaluer sa capacité de liaison à l'ADN. Ces études ont montré l'importance de la phosphorylation pour la liaison ArcA-ADN. ArcB contient 3 domaines catalytiques : le 1^{er} domaine localisé en N-ter contient un résidu histine His292, un 2^{ème} domaine central contient un résidu Aspartate Asp576 et un 3^{ème} domaine localisé en C-ter contient un résidu histidine His717. ArcA possède un résidu Aspartate Asp54 (figure 11).

Deux molécules d'ArcB forment deux ponts disulfures intermoléculaires entre les cystéines Cys180 et Cys241. Ces ponts disulfures inhibent l'autophosphorylation d'ArcB. En réponse à une chute de la concentration en dioxygène, les ponts disulfures sont rompus et ArcB s'autophosphoryle sur l'His292. Cette forme active va ensuite phosphoryler le résidu Asp54 de ArcA (**Kwon, Georgellis, *et al.* 2000**) via un système phosphorelai impliquant le transfert du groupement phosphate depuis His292 → Asp576 → His717 → Asp54 de ArcA (**Kwon, Georgellis, *et al.* 2000**).

Outre le dioxygène, d'autres facteurs influencent l'activation d'ArcA/ArcB. Il a été démontré que les quinones oxydées inactivent ArcB en inhibant son autophosphorylation. Cependant dans les conditions anaérobies, DMKH₂ et MKH₂ réduisent les cystéines en rompant le pont disulfure et par conséquent active la protéine ArcB (**Malpica *et al.* 2004**). De plus, les métabolites fermentatifs (D-lactate, pyruvate et acetate) favorisent l'autophosphorylation de la protéine ArcB (**Kwon, Georgellis, *et al.* 2000**). Bekker *et al.* en 2010 ont démontré que la délétion d'*ubiC*, codant pour une protéine essentielle pour la biosynthèse de Q₈ n'a pas d'effet sur la régulation d'ArcB dans la transition anaérobie-aérobie mais la délétion de *menB*, codant pour une protéine essentielle pour la biosynthèse de MK entraîne l'inactivation d'ArcB (**Bekker *et al.* 2010**). Il semble donc que MK joue un rôle dans l'activation d'ArcB.

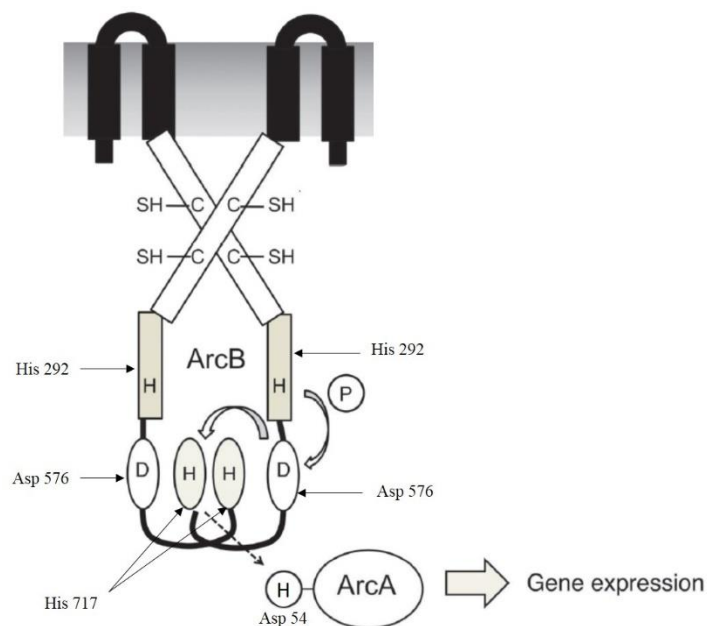


Figure 11: Transduction du signal à travers le système à deux composants Arc. 2 molécules ArcB forment deux ponts disulfures intermoléculaires entre les cystéines Cys180 et Cys241. ArcB est activée par autophosphorylation. Le groupement phosphate est transféré par un phosphorelai His → Asp jusqu'ArcA qui contrôle l'expression de nombreux gènes cibles. Adapté de (Naoko Fujimoto *et al.* 2012).

En conditions microaérophiles, ArcB est activée et permet l'induction de la quinol *bd* oxydase ainsi que la répression de la quinol *bo* oxydase (Cotter *et al.* 1997). En conditions anaérobies, l'expression de deux cytochromes sera inhibée par la protéine FNR (voir ci-dessous) (Bauer *et al.* 1999).

II.3.b. Système FNR :

FNR est une protéine cytoplasmique constitutive requise pour le passage de la respiration aérobie à la respiration anaérobie. Cette protéine sent directement la concentration intracellulaire en oxygène et agit comme un régulateur de transcription. En effet, FNR contient dans son domaine N-ter un centre [Fe-S] qui en conditions anaérobies se trouve sous forme [4Fe-4S] alors que lors d'un passage en condition aérobie, le dioxygène induit la conversion de ce centre en une forme [2Fe-2S] en quelques minutes (Crack *et al.* 2008). L'incubation pour une durée plus longue en présence d'oxygène cause la dégradation du centre [2Fe-2S] pour former une apoprotéine. Cette conversion oxydative du centre Fer-soufre est un processus réversible (Bauer *et al.* 1999).

Des études effectuées sur des mutants *fnr* révèlent la présence d'une région nécessaire pour l'interaction avec la sous unité α de l'ARN polymérase et de la présence de 4 cystéines localisés dans l'extrémité N-ter dont la mutation inactive FNR (**Bauer et al. 1999; Williams SM 1997**). Le mécanisme d'action de FNR a été aussi établi. FNR a la capacité de se lier à l'ADN par formation d'un homodimère. La perte du centre [4Fe-4S] par oxydation entraîne la conversion de la forme homodimérique qui se lie à la séquence de sa cible avec une très grande affinité en une forme monomérique qui a une très faible affinité de liaison avec l'ADN du gène cible (**Khoroshilova et al. 1995**). Par conséquent le centre [4Fe-4S] est essentiel pour l'activité de FNR.

Des analyses à grande échelle du génome d'*E. coli* montre que FNR régule l'activité d'environ 297 gènes dont les gènes induits dans la transition de l'aérobiose en anaérobiose (**Kang et al. 2005**). FNR active l'expression de gènes codant pour les systèmes respiratoires DMSO réductase, fumarate réductase, nitrate réductase et nitrite réductase. Il induit aussi l'expression des déshydrogénases anaérobies telles que la glycérol-3-phosphate et la formate déshydrogénase. D'autre part, FNR réprime l'expression de gènes codant pour les systèmes impliqués dans la respiration aérobie comme les quinols oxydases *bo* et *bd* (**Bauer et al. 1999**).

II.4. Régulation du taux de quinones :

Comme évoqué précédemment, la composition du pool de quinones d'*E. coli* est influencée par la disponibilité en dioxygène dans le milieu. Les cellules cultivées dans des conditions aérobies contiennent majoritairement du coenzyme Q alors qu'en conditions anaérobies les quinones majoritaires sont les DMK et MK (**Alexander and Young 1978a**). Le mécanisme de régulation du pool de quinones n'est pas encore connu. Shestopalov *et al.* (**Shestopalov et al. 1997**) ont montré que l'utilisation du chloramphénicol (inhibiteur traductionnel) n'a pas d'effet sur le changement de pool de quinones lors de la transition aérobie-anaérobie suggérant que la régulation de taux de quinones est post-traductionnelle. En plus, ces auteurs ont démontré que les systèmes de régulations transcriptionnels FNR et Arc n'ont pas d'effet sur le changement de la composition du pool de quinones entre des conditions aérobies et anaérobies (**Shestopalov et al. 1997**).

III. Biosynthèse des quinones chez *Escherichia coli*

III.1. Biosynthèse du coenzyme Q₈:

La biosynthèse du Q₈ chez *Escherichia coli* nécessite l'implication de 9 protéines UbiA-UbiH et UbiX. La plupart de ces gènes a été identifiée dans les années 70-80 grâce aux études effectuées par Cox, Young, Gibson et leurs collaborateurs (Cox *et al.* 1979; Gibson *et al.* 1978). Le phénotype utilisé pour l'isolement de mutants d'*E. coli* déficients en Q₈ repose sur le fait que ces mutants ne poussent pas dans un milieu respiratoire. En effet, le coenzyme Q est essentiel pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire aérobie puisque des mutants d'*E. coli* déficients en Q₈ sont capables de pousser en fermentation sur glucose mais pas en respiration aérobie avec le succinate ou le malate comme unique source de carbone (Gibson 1973). Certains mutants incapables de biosynthétiser du Q₈ montrent l'accumulation d'intermédiaires de biosynthèse dont la caractérisation par spectrométrie de masse et RMN a permis de proposer l'implication du gène muté dans une étape particulière de la biosynthèse. L'ensemble des résultats obtenus, complétés par des études du laboratoire de C. Clarke dans les années 2000 a permis de proposer la voie de biosynthèse de Q illustrée dans la figure 12.

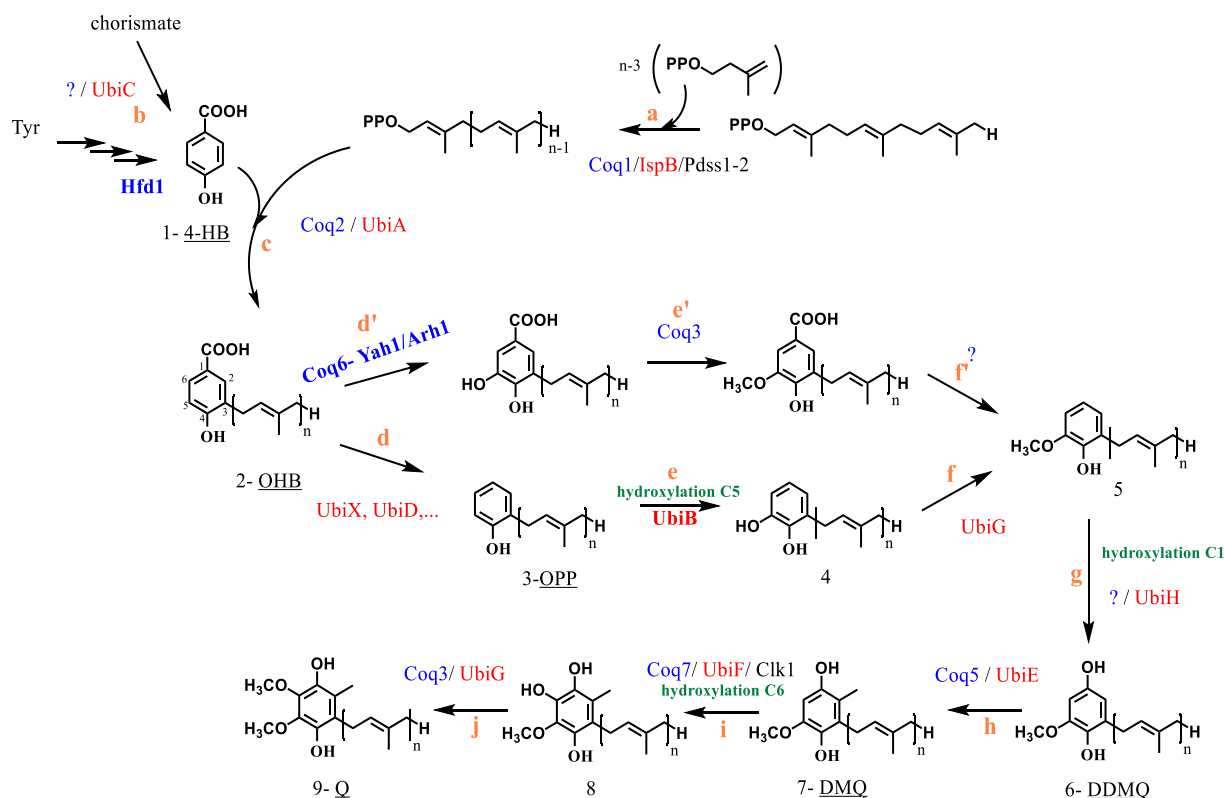


Figure 12: Voie de biosynthèse du coenzyme Q chez la bactérie *E. coli* et la levure *S. cerevisiae*. Les protéines impliquées chez la levure sont marquées en bleu, les protéines impliquées chez *E. coli* sont marquées en rouge et

les protéines impliquées chez les mammifères sont indiquées en noir. Les enzymes non identifiées sont marquées par un « ? ». Les 3 réactions d'hydroxylations sont indiquées en vert. 4-HB : 4-hydroxybenzoate ; OHB : 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate ; DDMQ : diméthyl-déméthoxyubiquinol ; DMQ : diméthoxyubiquinol ; Q : ubiquinol.

Certaines protéines de la voie de biosynthèse de Q₈ sont codées par des gènes qui sont organisés en opéron (figure 13) : les gènes *ubiE*, *ubiB* et *yigP* (Poon *et al.* 2000); les gènes *ubiH* et *visC* (Nakahigashi *et al.* 1992) ;et finalement les gènes *ubiA* et *ubiC* (Kwon *et al.* 2005). Les autres gènes sont soit localisés dans un opéron avec des gènes non essentiels pour la biosynthèse de Q₈, soit localisés seuls sur le chromosome bactérien.

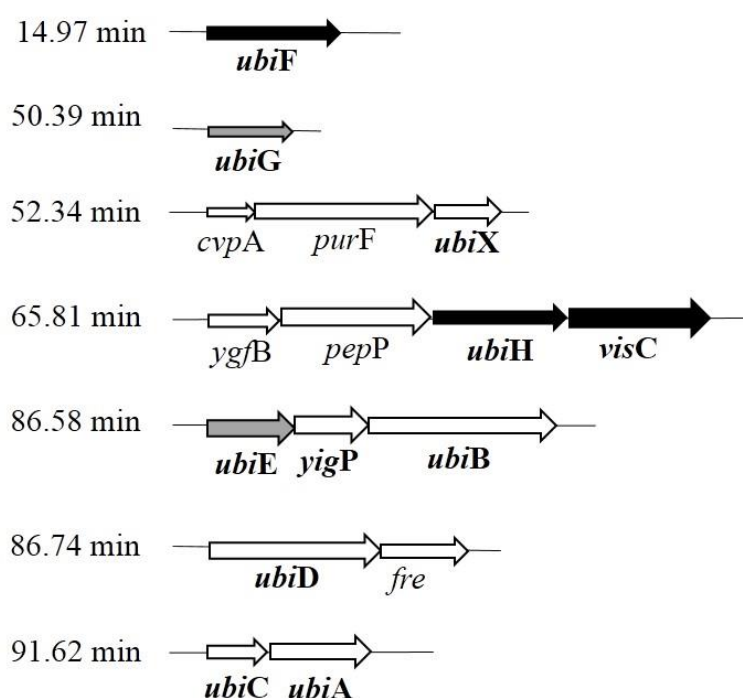


Figure 13 : Organisation génétique des gènes *ubi* chez *E. coli* : La localisation de l'opéron sur le chromosome est indiquée. Les gènes essentiels pour la biosynthèse de Q₈ sont marqués en gras. Les gènes codant pour les monoxygénases sont marqués par des flèches noires tandis que les gènes codant pour les méthyltransférases sont marqués par des flèches grises. Adapté d'Aussel *et al.* 2014 (Aussel, Pierrel, *et al.* 2014).

La voie de biosynthèse de Q₈ commence par la formation du 4-hydroxybenzoate (4-HB), le précurseur du noyau aromatique de Q₈. Le 4-HB provient du chorismate produit par la voie du shikimate chez *E. coli* (réaction b, figure 12) (Meganathan 2001). Le 4-HB est prénylé par l'octaprényl-diphosphate-4HB-transférase (UbiA) pour former le 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate (OHB, composé 2, figure 12). Cette étape de prénylation est suivie par des réactions de décarboxylation, hydroxylation et méthylation du noyau aromatique. L'ordre de réactions n'est pas le même si on compare les voies de biosynthèse de Q₈ chez *E. coli* et Q₆.

chez *Sacharromyces cerevisiae*. Chez *E. coli*, la décarboxylation (réaction d) intervient avant l'hydroxylation (réaction e) sur le carbone 5, tandis que chez *S. cerevisiae*, la décarboxylation (réaction f') intervient après l'hydroxylation en C5 (réaction d').

III.2. Les étapes de biosynthèse du Q₈:

La figure 14 montre la structure générale du coenzyme Q. Il a été démontré que les groupes méthyles sur le noyau benzénique sont dérivés de la S-adénosylméthionine (SAM) (Jackman *et al.* 1967) et le dioxygène moléculaire est la source des atomes d'oxygène présents en C5, C6 et C1 (Alexander *et al.* 1978b). Les précurseurs de la chaîne polyprényle dérivent du 2-C-méthyle-D-érythritol 4-phosphate (MEP) (Rohmer 1999).

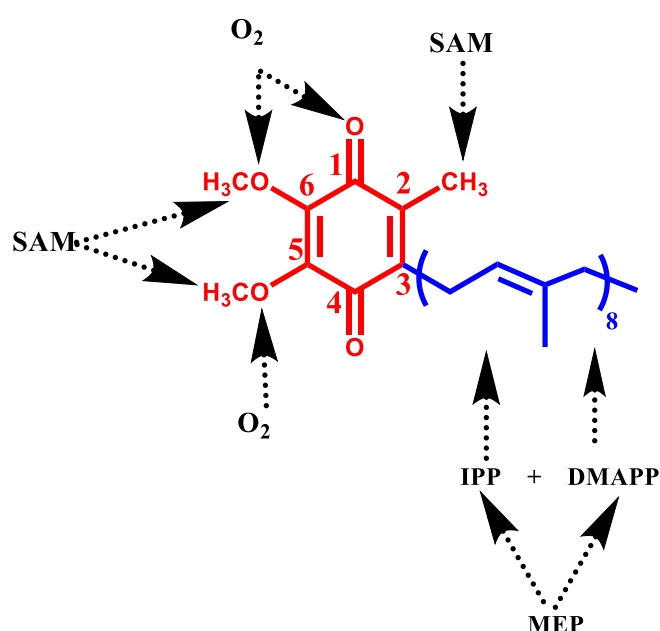


Figure 14 : Structure du coenzyme Q : Q₈ est représenté sous sa forme oxydée avec le noyau quinone en rouge et la chaîne polyisoprényle en bleu. La numérotation des atomes de carbone utilisée dans ce manuscrit est montrée sur le noyau quinone. La source de méthyle, de l'oxygène et de la chaîne polyisoprényle sont la SAM, le dioxygène moléculaire et le MEP (2-C-méthyle-D-érythritol 4-phosphate) respectivement. Adapté de Meganathan *et al.* (Meganathan 2001).

Dans cette partie, les différentes étapes de biosynthèse de Q₈ sont décrites. De plus, de nombreuses expériences de complémentation hétérologue entre *E. coli* et *S. cerevisiae* seront également mentionnées.

III.2.a. Biosynthèse du 4-hydroxybenzoate, le précurseur du noyau aromatique du Q₈ :

Le 4-hydroxybenzoate (4-HB) (composé 1) provient du chorismate qui est produit par la voie du shikimate. Il a été démontré que [G-¹⁴C]-shikimate utilisé lors d'une culture d'une souche sauvage WT est incorporé dans la structure de Q₈ biosynthétisé (Siebert *et al.* 1994). La formation de 4-HB (réaction b) est catalysée par la protéine UbiC (chorismate pyruvate lyase). Récemment, il a été reporté que la protéine XanB2 chez *Xanthomonas campestris* est capable de produire 4-HB à partir du chorismate (Zhou *et al.* 2013). Cette protéine est présente chez quelques procaryotes mais pas chez *E. coli*.

La structure cristallographique d'UbiC avec le produit final 4-HB a été résolu à une résolution de 1,4 Å (Smith *et al.* 2006). Cette étude révèle que la structure de l'enzyme consiste en 6 feuillets β anti-parallèles et que le 4-HB est lié dans une cavité interne hydrophobe derrière deux volets qui le couvre complètement et le protège du solvant. Smith *et al.* proposent que la structure contient 2 sites de liaisons de produits connectés par un tunnel (Smith *et al.* 2006) : un site primaire (catalytique) liant le 4-HB et un site secondaire liant le substrat (chorismate). La liaison du chorismate au niveau du site secondaire déclenche la libération de 4-HB suivi par un déplacement du chorismate vers le site primaire où il est rapidement converti en 4-HB et en pyruvate. Le pyruvate est une petite molécule qui quitte rapidement le site primaire et le 4-HB maintient sa place jusqu'à liaison d'une nouvelle molécule du chorismate. Ce mécanisme se répète de façon cyclique.

III.2.b. Biosynthèse et liaison de la chaîne octaprényle :

IPP (Isopentényl diphosphate) et DMAPP (diméthyl-allyl-diphosphate) sont deux isomères qui constituent les précurseurs des isoprénoides chez les êtres vivants. Ces deux métabolites sont issus de deux voies de biosynthèse: Chez les eucaryotes, IPP dérive de la voie de mévalonate tandis que chez les bactéries, l'IPP est formé à partir du 2-C-méthyle-D-

érythritol 4-phosphate (MEP), un intermédiaire de la voie non mévalonate (**Rohmer 1999; Disch *et al.* 1998**) ou MEP. Chez les algues vertes et les plantes supérieures, les deux voies existent.

III.2.b.1. La voie mévalonate :

Cette voie de biosynthèse de l'IPP se trouve chez les eucaryotes. La voie de mévalonate utilise l'acétyl-coA comme point de départ tout comme la biosynthèse des acides gras. La condensation de 3 Acétyl-coA mène à l'hydroxyl-méthyl-glutaryl coA (HMG-coA) qui sera ensuite réduit en mévalonate. Deux phosphorylations successives fournissent successivement le phosphomévalonate et le diphosphomévalonate. Ce dernier intermédiaire est ensuite soumis à une phosphorylation de son groupement hydroxyle suivie d'une décarboxylation qui conduit à l'IPP.

III.2.b.2. La voie MEP :

A la différence de la voie du mévalonate, cette voie utilise des dérivés de glucide pour aboutir à l'IPP. Le pyruvate et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate sont les précurseurs de l'IPP. Brièvement, le produit de décarboxylation du pyruvate se condense avec l'aldéhyde de D-glycéraldéhyde pour former le 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP). DXP subit ensuite un réarrangement de son cycle suivi par une réduction pour former le MEP.

III.2.b.3. Biosynthèse de la chaîne octaprényle :

La formation de l'octaprényl diphosphate (OdP, composé 5, figure 15) à partir de l'IPP nécessite la présence de 3 enzymes : *idi*, *ispA* et *ispB*.

- isopentényl diphosphate isomérase ou *idi* permet l'isomérisation de l'IPP en diméthylallyl diphosphate (DMAPP, composé 1, figure 15).
- Farnésyl diphosphate synthase ou *ispA* : *ispA* condense une molécule de DMAPP avec une molécule d'IPP pour former le géranyl diphosphate (GPP, composé 3, figure 15) puis une seconde molécule d'IPP est ajoutée pour former le farnésyl diphosphate (FPP, composé 4, figure 15). Le FPP est le produit final de la FPP synthase qui ne peut pas assurer une élongation supplémentaire.

L'analyse de séquence de FPP-synthase révèle la présence de 2 régions riches en aspartate, très conservées chez les différentes polyprényles diphosphate synthase. Ces 2 régions constituent les sites de liaison de l'IPP et du substrat condensé avec l'IPP (GPP dans le cas de FPP synthase) (Okada *et al.* 1997). Les ions Mg^{2+} sont nécessaires pour une activité optimale de l'enzyme (Okada *et al.* 1997).

- La polyprényle diphosphate synthase ou *ispB* : *ispB* permet l'élongation de la chaîne polyprényle à partir de FPP par condensations successives de molécules d'IPP. La longueur de la chaîne polyprényle présente sur le coenzyme Q est spécifique de chaque organisme et est déterminée par la polyprényle diphosphate synthase présente chez ces organismes. Par exemple le coenzyme Q d'*E. coli* possède une chaîne octaprényle (C40, composé 5, figure 15) composée de 8 unités isoprényles; *S. cerevisiae* possède une chaîne hexaprényle (C30), Q₆. La séquence d'acides aminés de la protéine IspB et des isoprényle-diphosphate-synthases d'autres organismes contient sept motifs différents hautement conservés. Ces sept motifs, riches en résidus aspartate, sont cruciaux pour l'activité catalytique de l'enzyme (Kainou *et al.* 2001).

L'expression hétérologue de polyprényle diphosphate synthases permet de changer la nature du coenzyme Q endogène d'*E. coli* et *S. cerevisiae*. Du coenzyme Q₅-Q₁₀ ont été produit chez *S. cerevisiae* et du coenzyme Q₇-Q₁₀ ont été produits chez *E. coli* (Okada *et al.* 1998; Okada *et al.* 1997) en exprimant des polyprényle diphosphate synthases de *R. capsulatus* (Q₉), *G. suboxydans* (Q₁₀) et *H. influenzae* (Q₇). Ces différentes isoformes de Q sont fonctionnelles puisqu'elles permettent le rétablissement de la respiration dans des souches délétées pour la polyprényle diphosphate synthase endogène. Ceci suggère que la longueur de la chaîne polyisoprényle influence peu la fonction de Q au niveau de la chaîne respiratoire.

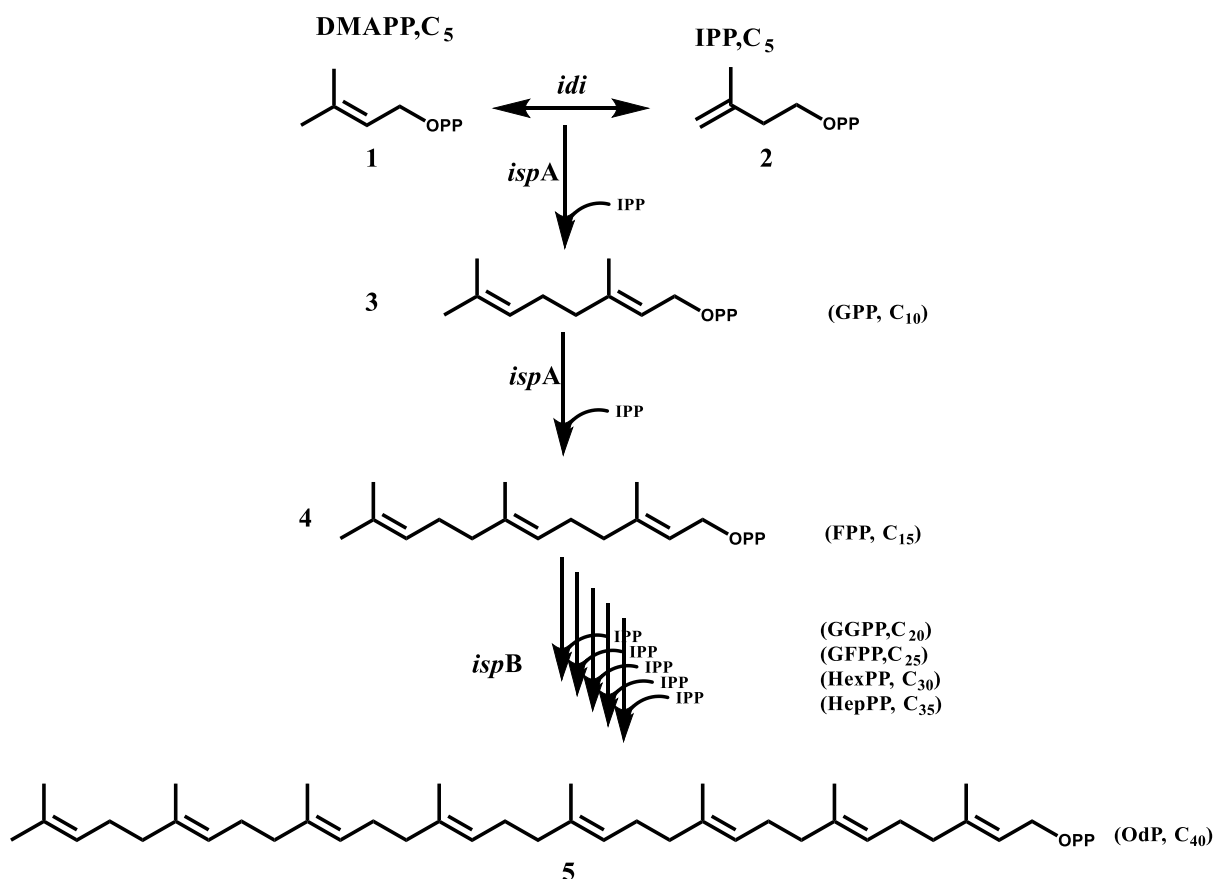


Figure 15 : Biosynthèse de polyprényl diphosphate à partir de l'isopentényl diphosphate (IPP) chez *E. coli* : DMAPP : Diméthylallyl diphosphate ; IPP : isopentényl diphosphate ; GPP : Géranyl diphosphate ; FPP : Farnésyl diphosphate ; OdP : Octaprényl diphosphate. Adapté de (Meganathan 2001).

Q₁₀ a un intérêt commercial car cette molécule est utilisée dans de nombreux compléments alimentaires. Deux groupes ont ainsi manipulé génétiquement *E. coli* pour lui faire produire Q₁₀ (Zahiri *et al.* 2006; Park *et al.* 2005). Dans les deux cas, une décaprényl diphosphate synthase (*ddsA*) de microorganismes produisant naturellement Q₁₀ a été exprimé chez une souche *E. coli* recombinante (exprimant le plasmide portant le gène *ddsA*) et a conduit à la biosynthèse de Q₁₀ en plus de Q₈ qui est produit de façon endogène. De plus, il a été reporté que du Q₁₀ a été produit avec succès dans le riz *Oryza sativa* qui produit généralement du Q₉ (Takahashi *et al.* 2006).

III.2.b.4. Liaison de la chaîne octaprényle :

La prénylation du 4-HB (composé 1) en 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate (OHB, composé 2) est effectuée par l'enzyme 4-hydroxybenzoate octaprényltransférase codée par le gène *ubiA* (réaction c, figure 12).

L'analyse de séquence d'UbiA révèle la présence de 2 domaines conservés, riche en aspartate, impliqués dans la fixation de la chaîne octaprényle et sont communs à la superfamille des polyprényltransférases. La protéine UbiA est une protéine intégrale à la membrane nécessitant Mg^{2+} pour son activité optimale (Young *et al.* 1972). Il a été proposé que Mg^{2+} est essentiel pour stabiliser la liaison entre les résidus aspartate et le groupement pyrophosphate de l'OdP. La présence du groupement carboxyle sur le carbone C1 du substrat est essentielle pour être reconnu par UbiA (Cheng *et al.* 2014).

La localisation membranaire d'UbiA a été récemment confirmée par la structure cristallographique d'UbiA d'*Aeropyrum pernix* qui révèle la présence de 9 hélices transmembranaires et un domaine extramembranaire qui entoure une cavité centrale contenant le site actif (figure 16) (Cheng and Li 2014). Afin de faciliter la catalyse à l'intérieur de la membrane, il est proposé que la cavité centrale s'ouvre latéralement dans la bicouche lipidique permettant l'accueil de l'OdP qui est lui-même situé dans la bicouche ainsi que la libération du produit final (OHB, composé 2, figure 12) dans la membrane. La liaison de la chaîne isoprényle induit un changement conformationnel local du site actif mais la structure générale n'est pas modifiée (Cheng and Li 2014).

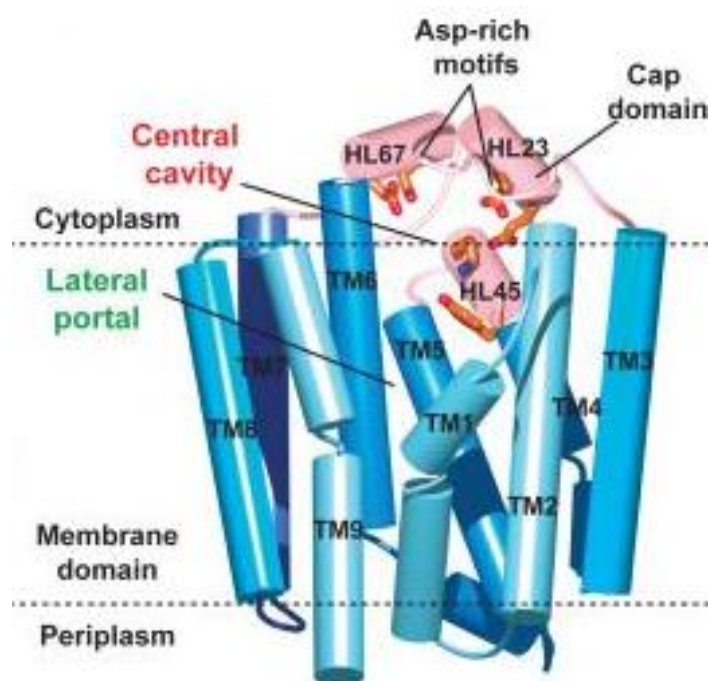


Figure 16 : Structure de la protéine UbiA : La structure de la protéine UbiA chez *Aeropyrum pernix* révèle la présence de 9 domaines transmembranaires (indiqués en bleu) et un domaine cytoplasmique contenant le site actif (montré en rose). La cavité centrale contient une porte qui s'ouvre latéralement dans les membranes. D'après (Cheng and Li 2014).

Cette structure révèle aussi la présence d'un site basique de liaison de 4-HB proche du site de liaison de la chaîne isoprényle. La mutation des résidus constituant ce site basique affecte la liaison du 4-HB. Une fois le 4-HB fixé, UbiA clive le pyrophosphate de l'OdP pour générer un carbocation qui réagit avec le carbone 3 du cycle aromatique du 4-HB pour former une liaison C-C. Il a été proposé que les ions Mg^{2+} déclenchent la formation de ce carbocation dont la stabilité est assurée par le résidu aspartate 184.

Un mutant *ΔubiA* est déficient pour la biosynthèse de Q_8 mais celui-ci est complété par l'expression de Coq2, l'homologue d'UbiA chez *S. cerevisiae* (Suzuki *et al.* 1994).

La famille des polyprényltransférases impliquées dans la biosynthèse de coenzyme Q n'est pas spécifique pour la longueur de la chaîne polyisoprényle à lier à 4-HB. En fait, il a été démontré qu'UbiA peut utiliser en plus de l'octaprényl diphosphate, les farnésyl (C_{15}), phytol (C_{20}) solanésyl (C_{45}) et décaprényle (C_{50}) diphosphate comme précurseur de la chaîne polyisoprényle (el-Hachimi *et al.* 1974).

Cette manque de spécificité s'étend aussi au précurseur de noyau aromatique de Q. En effet, en plus du 4-HB, plusieurs équipes dont la nôtre ont démontré que l'acide vanillique (VA), le 3,4-dihydroxybenzoate (3,4-diHB) et le pABA (para-aminobenzoate) (figure 17) peuvent être utilisés par Coq2 pour former le coenzyme Q (Pierrel *et al.* 2010; el-Hachimi *et al.* 1974). Chez *E. coli*, UbiA peut aussi prényler ces analogues de substrats pour former du Q_8 sauf dans le cas du pABA (Wessjohann *et al.* 1996; Xie *et al.* 2015).

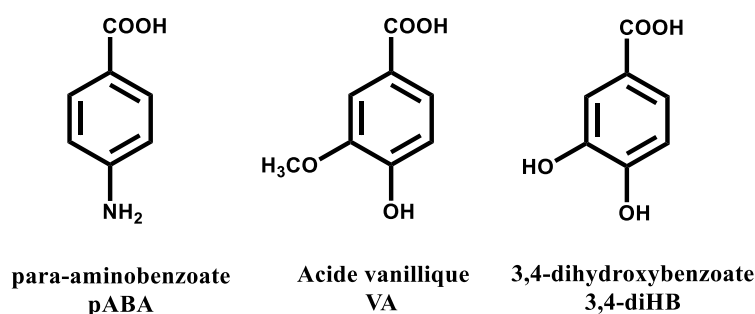


Figure 17 : Structures des analogues de substrats prénylées par UbiA et/ou Coq2.

III.2.c. Décarboxylation du 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate

La décarboxylation du 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate (OHB, composé 2) en 3-octaprénylphénol (OPP, composé 3) est catalysée par les 2 protéines UbiD et UbiX (les 2 protéines font partie de la famille de polyprényl-4-hydroxybenzoate décarboxylase). UbiD a été découverte en 1969 par Cox et ses collaborateurs (**Cox et al. 1969**). Un mutant *ΔubiD* biosynthétise 20% de Q₈ en comparant à une souche WT et accumule une grande quantité d'OHB. La biosynthèse résiduelle de Q₈ est en accord avec le fait qu'il existe une seconde décarboxylase (**Leppik et al. 1976**). En 1980, l'enzyme catalysant la décarboxylation de l'OHB et codée par le gène *ubiX* a été décrite chez *Salmonella typhimurium* (**Howlett et al. 1980**). Un gène *ubiX* a été identifié plus tard chez *E. coli* ayant 70% d'identité de séquence avec celui de *S. typhimurium*. L'inactivation d'UbiX entraîne une déficience partielle de la biosynthèse de Q₈ accompagnée de l'accumulation de l'OHB suggérant un rôle de décarboxylase joué par cette protéine (**Gulmezian et al. 2007**).

Des données structurales sur UbiX sont disponibles grâce aux études effectuées sur les protéines UbiX d'*E. coli* O157 :H7 (**Rangarajan et al. 2004**), de *Colwellia psychrerythraea* (**Do et al. 2015**) et de *Pseudomonas aeruginosa* (**Kopec et al. 2011**). Les 3 structures révèlent l'organisation d'UbiX en dodécamère (12 sous-unités) dans lequel chaque sous-unité possède une séquence de type Rossmann Fold capable de lier la flavine mononucléotide (FMN). Ce cofacteur FMN se localise à l'interface entre 2 monomères. Les structures d'UbiD chez *E. coli* (données non publiées) et *Pseudomonas aeruginosa* (**Jacewicz et al. 2013**) ont également été résolues mais sans cofacteurs liés. Chez *E. coli*, UbiD est un hexamère tandis que chez *P. aeruginosa*, UbiD est un dimère mais de manière intéressante, les deux protéines ont les mêmes structures tertiaires. UbiD possède 3 domaines avec un domaine central contenant un baril (barrel) de type β caractéristique des enzymes réductases dépendantes de flavine. Les structures révèlent qu'au niveau de ce domaine, il existe une poche qui pourrait fixer la FMN.

Une question récurrente est de savoir comment UbiD et UbiX fonctionnent ensemble pour assurer la décarboxylation d'OHB en OPP ? UbiD et UbiX chez *E. coli* ont des séquences protéiques homologues à celles de FDC (ferrulic acid decarboxylase) et PAD1 (phenylacrylic acid decarboxylase) chez *S. cerevisiae* (**Gulmezian et al. 2007; Zhang et al. 2003**). FDC et PAD1 assurent la production du styrène par décarboxylation de l'acide phénylacrylique (**Mukai et al. 2010**) mais ces protéines n'interviennent pas dans la biosynthèse de Q car les souches mutantes *ΔfdC1* et *Δpad1* ne sont pas déficientes en Q₆. L'activité de FDC dépend de la présence de PAD1. Une étude récente révèle que FDC et PAD1 forment un système de décarboxylation à 2 composants (**Lin et al. 2015**). En effet, PAD1 synthétise un cofacteur qui

est utilisé par FDC pour assurer la décarboxylation. Les auteurs suggèrent que ce cofacteur correspond à une forme modifiée de FMN. De manière intéressante, UbiX peut se substituer à PAD1 et assurer la production de styrène par stimulation de l'activité décarboxylase de FDC dans une souche *Δpad1* (Lin *et al.* 2015). De plus, PAD1 restaure la biosynthèse de Q₈ dans une souche *ΔubiX* (Gulmezian *et al.* 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que PAD1 et UbiX sont des enzymes isofonctionnelles et qu'UbiD catalyse la décarboxylation de l'OHB grâce à un cofacteur synthétisé par UbiX. En 2015, la structure de ce cofacteur a été établie par White *et al.* (White *et al.* 2015) qui ont montré par des études cristallographiques et des expériences de stop flow qu'UbiX fonctionne comme une prényltransférase qui catalyse la liaison d'un fragment du diméthylallyl (DMAP) aux atomes N5 et C6 du cycle isoalloxazine de la flavine (FMN). Cette réaction catalysée par UbiX entraîne l'addition d'un 4^{ème} cycle non aromatique aux 3 cycles du noyau isoalloxazine et forme donc un nouveau cofacteur qui est ensuite utilisé par UbiD pour catalyser la décarboxylation de l'OHB (White *et al.* 2015).

III.2.d. Réactions de méthylation :

Trois réactions de méthylation dont deux sur un groupement hydroxyle et une sur un groupement méthyle ont lieu dans la biosynthèse de Q₈ chez *E. coli*. Ces réactions sont :

Méthylation en O5 : 3-octaprényl-5-hydroxyphenol (composé 4) → 3-octaprényl-5-méthoxyphenol (composé 5) (réaction f)

Méthylation en C2 : 3-octaprényl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (DDMQ₈, composé 6) → 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (DMQ₈, composé 7) (réaction h)

Méthylation en O6 : 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-6-hydroxy-1,4-benzoquinol (composé 8) → ubiquinol (Q₈, composé 9) (réaction j).

Les réactions de méthylation s'alternent avec les réactions d'hydroxylation (décrites en III.2.e.). L'alignement des séquences de différentes méthyltransférases a révélé la présence de 3 motifs conservés et communs aux enzymes utilisant la SAM comme donneur des groupements méthyles (Kagan *et al.* 1994). Ces motifs, nécessaires pour la liaison de la SAM sont ainsi présents chez Coq3 (*S. cerevisiae* (Clarke *et al.* 1991)), UbiG (O-méthyltransférase chez *E. coli* (Wu *et al.* 1992)) et la catéchol O-méthyl transférase (Vidgren *et al.* 1994).

III.2.d.1. Méthylation en C2 :

La seule C-méthyle transférase de la voie de biosynthèse de Q₈ est codée par *ubiE*. Ce gène a été découvert grâce aux travaux de Young et ses collaborateurs en 1971 qui ont montré qu'un mutant *ubiE* (*ubiE401*) est déficient en Q₈ et accumule le DDMQ₈ (composé 6, figure 12) (Young *et al.* 1971). En 1997, Lee *et al.* ont pu démontrer qu'*ubiE401* est un mutant ponctuel dans lequel le résidu Asp 142 est muté en Gly (Lee *et al.* 1997). Ce résidu est situé juste après le 2ème motif conservé qui correspond à une région où se lie la SAM et le catéchol (le substrat) dans la structure cristallographique de la catéchol O-méthyle transférase (Vidgren *et al.* 1994). Sur la base de ces résultats, les auteurs ont proposé que la mutation D142G pourrait perturber la liaison de la SAM et du DDMQ dans UbiE. Il a été démontré que deux mutants ponctuels du gène *coq5* de *S. cerevisiae* sont complétés par la surexpression d'UbiE, établissant ainsi que Coq5 est l'homologue d'UbiE chez *S. cerevisiae* (Lee *et al.* 1997). Outre la biosynthèse de Q, UbiE intervient également dans la voie de biosynthèse de MK₈ pour méthyler DMK₈. Par conséquent, un mutant Δ *ubiE* est déficient en MK₈ et Q₈ et accumule DDMQ₈ et DMK₈ (Wissenbach *et al.* 1992).

III.2.d.2. Méthylations en O5 et O6 :

Ces 2 réactions de méthylation sont catalysées par UbiG. Le gène qui code pour cette protéine a été découvert sur la base des résultats de Stroobant *et al.* en 1972 (Stroobant *et al.* 1972). En fait, ces auteurs ont pu isoler 2 mutants d'*ubiG* capables de produire 5% de Q₈ et accumulant deux intermédiaires : le 3-Octaprényl-5-hydroxyphénol (composé 4, figure 12) et le 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-6-hydroxy-1,4-benzoquinol (composé 8, figure 12). Un alignement de séquence d'UbiG et de ces homologues révèle 40% d'identité de séquence entre UbiG et Coq3 de *S. cerevisiae* (Hsu *et al.* 1996). D'ailleurs, la surexpression d'un plasmide contenant le gène *ubiG* précédé d'une séquence d'adressage mitochondriale rétablit la biosynthèse de Q₆ et la capacité d'une souche Δ *coq3* à pousser sur un milieu respiratoire (Hsu *et al.* 1996).

III.2.e. Réactions d'hydroxylation :

Trois monooxygénases catalysent les réactions d'hydroxylation sur les atomes de carbone C5, C1 et C6. Ces réactions sont :

Hydroxylation en C5 : 3-octaprénylphénol (composé 3) \rightarrow 3-octaprényl-5-hydroxyphénol (composé 4) (réaction e)

Hydroxylation en C1 : 3-octaprényl-5-méthoxyphénol (composé 5) \rightarrow 3-octaprényl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (composé 6) (réaction g)

Hydroxylation en C6 : 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (composé 7) \rightarrow 3-octaprényl-2-méthyl-6-hydroxy-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (composé 8) (réaction i)

UbiB était proposée pour catalyser l'hydroxylation C5, alors qu'UbiH et UbiF interviennent dans les hydroxylation en C1 et en C6, respectivement (**Alexander and Young 1978a**).

III.2.e.1. Hydroxylation en C5 :

UbiB a été initialement proposée pour être impliquée dans cette réaction d'hydroxylation puisqu'un mutant *ΔubiB* est déficient en Q₈ et accumule le 3-octaprénylphénol (OPP, composé 3, figure 12) (**Poon et al. 2000**). Cependant, l'accumulation d'OPP n'est pas caractéristique d'une déficience en hydroxylation en C5 puisque cet intermédiaire de biosynthèse s'accumule aussi dans un mutant *ΔubiG* (**Hsu et al. 1996**). Par ailleurs, UbiB ne possède aucune homologie de séquence avec les monooxygénases, mais plutôt avec des protéines kinases eucaryotes (**Poon et al. 2000**) et récemment, une activité kinase a été mise en évidence pour ADCK3, l'homologue humain d'UbiB (**Stefely et al. 2014**). Une fonction d'hydroxylase pour UbiB était donc discutable et je démontre en effet dans le chapitre I des résultats, que l'hydroxylation en C5 est catalysée par le produit du gène *visC* (que nous avons renommé UbiI) localisé en opéron avec le gène *ubiH*.

III.2.e.2. Les deux autres réactions d'hydroxylation :

III.2.e.2.i. Identification des protéines UbiH et UbiF:

UbiH a été identifiée comme étant la protéine qui catalyse la réaction d'hydroxylation en C1 sur la base de la déficience en Q₈ et de l'accumulation de 3-octaprényl-5-méthoxyphénol (composé 5, figure 12) dans une souche *ΔubiH* (**Young et al. 1973**). En 1992, Nakahigashi *et al.* ont isolé un mutant *ΔvisB* montrant un phénotype de photosensibilité (**Nakahigashi et al.**

1992). La localisation chromosomale de *visB* (63 min) ainsi que la complémentation d'un mutant *ΔubiH* par surexpression de *visB* montrent qu'*ubiH* et *visB* sont les mêmes gènes. En cherchant la cause de la photosensibilité, les auteurs ont démontré que la souche *ΔvisB* est photosensible à cause de l'accumulation du composé 5 (Nakahigashi *et al.* 1992). Ce phénotype de photosensibilité n'est plus présent dans la souche *ΔvisB ΔubiA* qui n'accumule plus le composé 5. *visC* est un gène localisé en opéron avec *visB*, mais la souche *ΔvisC* n'est pas photosensible (Nakahigashi *et al.* 1992).

Une recherche BLAST avec la séquence d'UbiH, a montré qu'une séquence codée par le gène *yleb* comporte 31% d'identité de séquence et 46% de similarité de séquence avec UbiH (Kwon, Kotsakis, *et al.* 2000). Ce gène a été caractérisé comme étant requis pour la biosynthèse de Q puisque sa délétion entraîne l'accumulation de DMQ₈ (composé 7, figure 12). La surexpression de ce gène dans le mutant *ΔubiF* restaure la biosynthèse de Q₈ et la capacité de ce mutant à pousser sur un milieu respiratoire. L'ensemble de ces résultats démontre que la protéine YLEB/UbiF est responsable de la réaction d'hydroxylation en C6.

La surexpression de CLK-1 (homologue d'UbiF chez *C. elegans*) et de COQ7 (homologue d'UbiF chez *Pseudomonas aeruginosa*) dans un mutant *ΔubiF* rétablit la biosynthèse de Q₈. (Stenmark *et al.* 2001; Adachi *et al.* 2003). UbiF, quant à elle, restaure la capacité d'un mutant ponctuel *coq7* (chez *S. cerevisiae*) de pousser sur un milieu respiratoire et donc a rétabli la biosynthèse de Q₆ dans ce mutant (Tran *et al.* 2006). Il est important de mentionner qu'UbiF est un homologue fonctionnel à Coq7. En effet, UbiF est une monooxygénase à flavine (voir ci-dessous) alors Coq7 appartient à la famille des hydroxylases bi-nucléaires à fer (Stenmark *et al.* 2001).

L'alignement de séquences d'UbiF, d'UbiH et de PHHY (RopA de *Pseudomonas aeruginosa* ; p-hydroxybenzoate hydroxylase, l'enzyme prototype des hydroxylases à flavine) révèle une identité de séquence entre ces 3 protéines (figure 18). Le motif DG (en rouge, figure 18) a été proposé pour lier les groupements pyrophosphate du FAD et du NADPH chez PobA (Eppink *et al.* 1997) alors que les résidus G298 et N300 (en rouge, figure 18) de PobA sont en contact avec l'anneau isoalloxazine du FAD. Les structures de ces protéines (UbiH et UbiF) ne sont pas disponibles.

```

sp|P25534|UBIH_ECOLI      ----MSVIIVGGGMAGATLALAI SRLSHGALPVHLIEATAPESH AHPGFDGRAIALAAG 55
sp|P75728|UBIF_ECOLI     MTNQPTETIAIVGGGMVGGALALGLAQHGFAVTVIEHAEFPAPFVADSQP--DVRISAISAA 58
sp|P20586|PHHY_PSEAE     ---MKTQVAIIIGAGPSGLLLGQLLHKAGIDNVILERQTPDYVLGRIRAG-----VLEQG 51

```

Introduction bibliographique

```

: * * * * * : : : : :
sp|P25534|UBIH_ECOLI TCQQLLARIGVWQSLADCAITTVHVSDRGHAGFVTLAAEDYQLAALGQVVELHNVGQRL 115
sp|P75728|UBIF_ECOLI SVSLLLKGLGVWDVAQAMRCHPYRRLETWEWETAHVVFDAELKLPLLGYMVENTVLQQAL 118
sp|P20586|PHHY_PSEAE MVDLLREAGVDRRMARDGLVHEGVEIAFAGQRRRIDLKRLSSGKTVT--VYGQTEVTRDL 109
. * ** : : . : : : :
sp|P25534|UBIH_ECOLI FALLRKAPGVTLHCPDRVANVARTQSHVEVTLE-SGE--TLTGRVLVAADCTHSALATAC 172
sp|P75728|UBIF_ECOLI WQALEAHPKVTLRVPGSLIALHRHDDLQELELK-GGE--VIRAKLVIGADGCANSQVRQMA 175
sp|P20586|PHHY_PSEAE MEAREACGATTVYQAAEVLHDLQGERPYVTFERDGERLRLDCDYIAGCDCFHGISRQSI 169
. .*: . : . : : : ** : : .** .
sp|P25534|UBIH_ECOLI GVDWQQEFYEQLLAVIANVATSVHAEGRAFERFTQHGPLAMLPMSDGRCS-LVWCHPLERR 231
sp|P75728|UBIF_ECOLI GIGVHAWQYAQSCMLISVQCENDPGDSTWQQFTPDGPRAFLPPLFDNWAS-LVWYDSPARI 234
sp|P20586|PHHY_PSEAE PAER-LKVFERVYPFGWLLGLADTPPVSHELIYANHPRGFALCSQRSATRSRYVQVPLS 228
: : : : : : : . * .: : : :
sp|P25534|UBIH_ECOLI EEVLSWSDEKFCRELQSAFGWRLGK--ITHAGKRSAYPLALTHAARSITHR-TVLVGNAAA 288
sp|P75728|UBIF_ECOLI RQLQNMNMAQLQAEIAKHFPSRLGY--VTPLAAG-AFPLTRRHALQYVQPG-LALVGDAAA 290
sp|P20586|PHHY_PSEAE EKVEDWSDERFWTELKARLPSEVAEKLVTGPSLEKSIAPLRSFVVEPMQHGRLFLAGDAAA 288
.: . . : : * : : .: . : * . : . . : : * .*:**
sp|P25534|UBIH_ECOLI QTLHPIAGQGFNLLMGRDVMSLAETLTQAQEE--RGEDMGDYGVLCRYQRRQSDREATIGV 346
sp|P75728|UBIF_ECOLI HTIHPLAGQGVNLGYRDVDALIDVLVNARS--YGEAWASYPVLVLKRYQMRRMADNFIMQSG 348
sp|P20586|PHHY_PSEAE HIVPPTGAKGLNLLAASDVSTLYRLLLKAYREGRGELLERYSAIC---LRRIWKAERFSWW 345
: : * .*:** . ** : * * : * ** * .: ** .
sp|P25534|UBIH_ECOLI TDSLVHLFANRWAPLVVGRNIGLMTMELFTPARDVLAQRTLGWVAR--- 392
sp|P75728|UBIF_ECOLI MDLFYAGFSNNLPPLFRMRNLGLMAAERAGVLKRQALKYALGL----- 391
sp|P20586|PHHY_PSEAE MTSVLHRFPDTDAFSQRIQQTELEYYLGSEAGLATIAENYVGLPLYEIE 394
. * : : : : : : :

```

Figure 18: Alignement de séquences des différentes mono-oxygénases à flavine. L'alignement a été généré avec ClustalW2. Les mono-oxygénases sont: UbiH et UbiF d'*E. coli*, PcbA (PHHY) de *Pseudomonas aeruginosa* (Palfey *et al.* 1994). Les acides aminés strictement conservés sont représentés en rouge.

III.2.e.2.ii. Mécanisme catalytique de monooxygénases à flavine du groupe A:

UbiH et UbiF montrent une similarité de séquence avec les monooxygénases dépendantes d'un cofacteur à flavine. Ces 2 protéines font partie du groupe A de monooxygénases à flavine ayant comme enzyme prototype la PHBH (para-hydroxybenzoate hydroxylase) rencontrée notamment chez *P. fluorescens* (**Huijbers *et al.* 2014**). Les monooxygénases du groupe A lient la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et utilisent le NAD(P)H comme cosubstrat.

Le cycle catalytique de PHBH a été largement étudié par spectrométrie stop flow et par fluorescence et est résumé dans la figure 19.

Ce cycle est divisé en 2 parties : une partie réductrice et une partie oxydative (**Husain *et al.* 1978**).

Dans la partie réductrice, l'enzyme contenant un FAD oxydé interagit avec le NADPH et le p-OHB (p-hydroxybenzoate) pour former un complexe à 3 composants (complexe tertiaire) (Réaction 1, figure 19). Ce complexe tertiaire est important pour une réduction rapide et contrôlée du FAD par le NADPH puisque la réduction du FAD est 100 000 fois moins rapide

dans le complexe binaire formé par l'enzyme et le NADPH uniquement (**Entsch, Ballou, Husain, et al. 1976**). De plus, la présence du substrat (p-OHB) est importante afin de limiter la réaction de la FAD réduite avec le dioxygène qui conduit à la formation d' H_2O_2 en absence de substrat (Réaction 8, figure 19) (**Entsch, Ballou, and Massey 1976**). Après la réduction du FAD, NADP^+ est libéré du complexe enzyme - p-OHB (Réaction 2, figure 19).

Dans la partie oxydative du cycle catalytique, l'enzyme contenant une FAD réduite réagit avec le dioxygène pour former un intermédiaire flavine hydroperoxyde (Réaction 3, figure 19). L'atome d'oxygène distal de l'hydroperoxyde (en rouge, figure 19) est transféré au substrat pour former le produit de la réaction, le 3,4-diOHB (3,4-dihydroxybenzoate ; Réactions 4 et 5, figure 19).

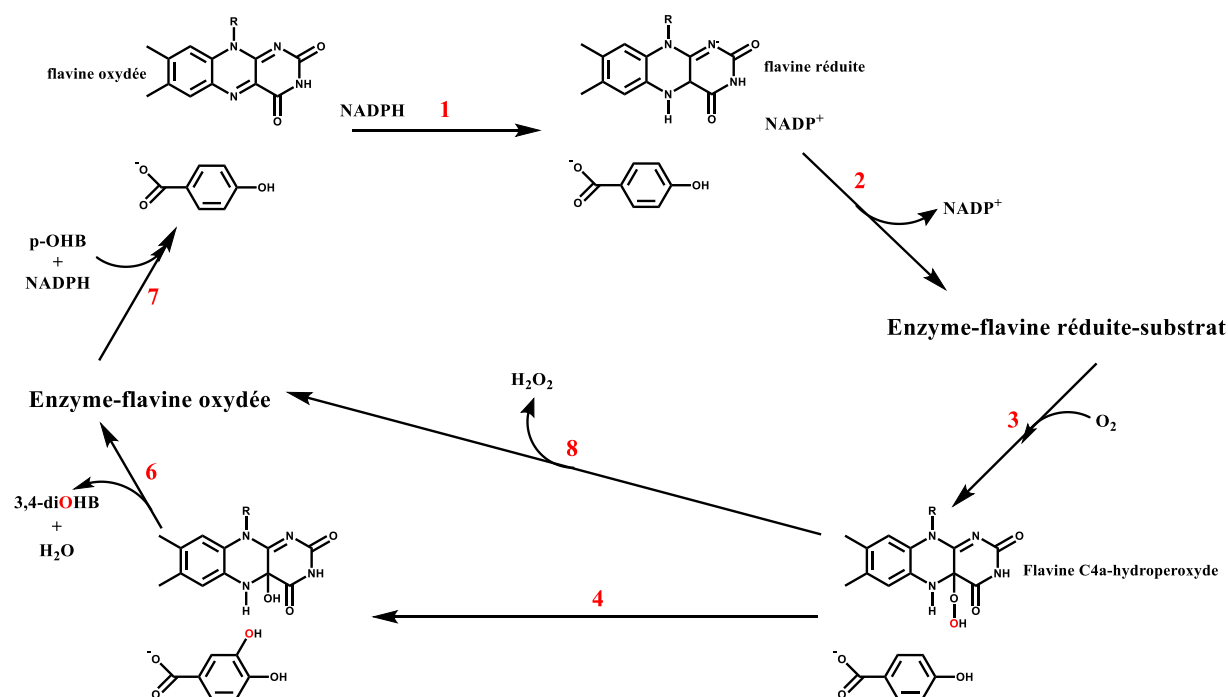


Figure 19 : Mécanisme d'action des monooxygénases à flavine – groupe A. Adapté de (**Palfey et al. 2010**).

Dans la dernière phase du cycle catalytique, une molécule d'eau est libérée de la FAD et le produit final (substrat oxydé) est libéré (réaction 6, figure 19), aboutissant ainsi au complexe enzyme-FAD oxydée, point de départ d'un nouveau cycle.

Outre ces investigations mécanistiques, la structure de PHBH de *P. fluorescens* a également été résolue (**Schreuder et al. 1994**). L'enzyme est un dimère contenant 3 domaines. Le domaine localisé à l'extrémité N-ter contient la séquence Rossman Fold responsable de la liaison de la FAD. Le domaine central contient un feuillet β responsable de la liaison du substrat. Le 3^{ème}

domaine est localisé à l'extrémité C-ter dont la fonction pourrait être de constituer l'interface entre les 2 sous-unités.

III.2.e.3. Origine des atomes oxygène :

Sur la base du cycle catalytique de PHBH et l'identité de séquence entre cette dernière et UbiH, UbiF, il est clair que les groupements hydroxyles ajoutés en C1 et C6 proviennent du dioxygène. Cependant, l'origine des groupements hydroxyles de la molécule de Q₈ a été déterminée avant la connaissance des séquences protéiques des hydroxylases. En effet, des expériences de marquage ont été réalisées en incubant une souche sauvage en présence de ¹⁸O₂ dans un milieu respiratoire strictement aérobique contenant du succinate. L'analyse par spectrométrie de masse du Q₈ biosynthétisé dans ces conditions a révélé une augmentation de la masse m/z de +6 par rapport au Q₈ produit par des cellules cultivées en ¹⁶O₂, indiquant que 3 atomes ¹⁸O₂ sont incorporés dans la molécule de Q₈ (**Alexander and Young 1978b**). Afin de déterminer la localisation des atomes d'oxygène marqués dans la molécule de Q₈, les auteurs ont effectué des expériences d'échange d'atomes d'oxygène dans des conditions acides. Dans ces conditions, seul l'oxygène du groupement carbonyle est échangé mais l'oxygène du groupement méthoxyle ne l'est pas. Les résultats de cette expérience montrent que l'incorporation de ¹⁸O₂ se fait aux positions 1, 5 et 6 (**Alexander and Young 1978b**). L'ensemble de ces résultats montrent que l'oxygène moléculaire fournit dans les groupements hydroxyles ajoutés lors des réactions d'hydroxylation.

III.2.e.4. Les réactions d'hydroxylation en anaérobie :

E. coli est capable de biosynthétiser du Q₈ en absence de dioxygène. Les différentes souches *ΔubiH*, *ΔubiF* et *ΔubiB* cultivées dans des conditions aérobies ne biosynthétisent pas Q₈. Cependant, en anaérobie ces souches ont la capacité de biosynthétiser du Q₈ à un niveau WT (**Alexander and Young 1978a**). Ainsi, il existe un système d'hydroxylation alternatif indépendant de ces trois protéines pour catalyser les réactions d'hydroxylation en anaérobie (**Alexander and Young 1978a**). Les autres mutants comme *ΔubiG*, *ΔubiE* sont déficients en Q₈ en anaérobiose tout comme en aérobiose, indiquant que ces gènes sont nécessaires dans les deux conditions (**Alexander and Young 1978a**). Les gènes codant pour les hydroxylases anaérobies ne sont pas connus. Dans le chapitre IV, je détaillerai notre étude visant à identifier les hydroxylases anaérobies.

III.3. Régulation de gènes de biosynthèse de coenzyme Q :

Comme déjà évoqué, le contenu en coenzyme Q varie en fonction de l'oxygène. De plus, la source de carbone (glucose, succinate, malate ...) pourrait influencer l'expression des gènes essentiels pour la biosynthèse de Q. Des études ont été faites sur l'expression de quelques gènes : Les gènes *ubiA* et *ubiC* sont localisés en opéron et la régulation de l'expression de cet opéron a été étudiée à l'aide de la construction *ubiAC-lacZ* (Kwon *et al.* 2005). Dans les conditions aérobies, la construction *ubiAC-lacZ* montre une activité élevée en comparant avec les conditions anaérobies (Kwon *et al.* 2005). Suzuki *et al.* (Suzuki *et al.* 1994) ont montré que l'expression de l'opéron *ubiCA* est réprimée 2 à 3 fois par le glucose en comparant avec une source de carbone respiratoire. L'expression de l'opéron *ubiCA* est beaucoup plus élevée en présence d'oxygène en comparant avec un milieu fermentatif. Dans une souche mutante $\Delta arcA$ cultivée en condition anaérobie, l'expression de l'opéron *ubiCA* est 50% plus élevée en comparant avec une souche WT cultivée dans les mêmes conditions alors que la mutation de *fnr* n'a pas d'effet sur l'activité de l'opéron *ubiCA-lacZ* (Kwon *et al.* 2005), en accord avec l'absence de sites de liaison de FNR au niveau de l'opéron *ubiCA* (Salmon *et al.* 2003).

L'expression des gènes *ubiD* et *ubiX* a également été étudiée par la fusion des promoteurs de ces gènes avec le gène *lacZ*. L'expression d'*ubiD* et *ubiX* dans les conditions aérobies dépend de la source de carbone disponible dans le milieu : succinate > glycérol > glucose. La mutation de *fnr* et d'*arcA* augmente 2,5 fois l'expression d'*ubiX* et 4 fois l'expression d'*ubiD* (Zhang and Javor 2003). Ces résultats suggèrent que l'activité de ces deux protéines est influencée par leur environnement.

Il a été démontré que l'étape de prénylation est limitante pour la biosynthèse de Q₈. La surexpression d'*UbiA* dans une souche sauvage WT entraîne une augmentation de taux de biosynthèse de Q₈ (Xu *et al.* 2014).

III.4. Biosynthèse des naphtoquinones :

Les précurseurs des noyaux benzoquinone et naphtoquinone qui alimentent respectivement les voies de biosynthèses de Q₈ et de MK₈ chez *E. coli* proviennent du chorismate. Ceci a été démontré par Cox et Gibson en 1964 par utilisation de shikimate marqué

(^{14}C) et leur observation que ce shikimate marqué est incorporé dans la structure de l'ubiquinone et des naphtoquinones (Cox *et al.* 1964).

Les 2 voies de biosynthèse utilisent également l'octaprényl-pyrophosphate. Pour le reste, les 2 voies sont indépendantes à l'exception de l'étape de C-méthylation catalysée par UbiE qui entraîne la formation de MK_8 à partir de DMK_8 (Wissenbach *et al.* 1992).

6 enzymes Men (MenB-MenF, MenH)) sont nécessaires pour synthétiser le 1,4-dihydroxy-2-naphtoate (DHNA) à partir de chorismate (figure 20). DHNA est ensuite prénylé par menA pour former DMK_8 puis UbiE assure la méthylation pour former MK_8 .

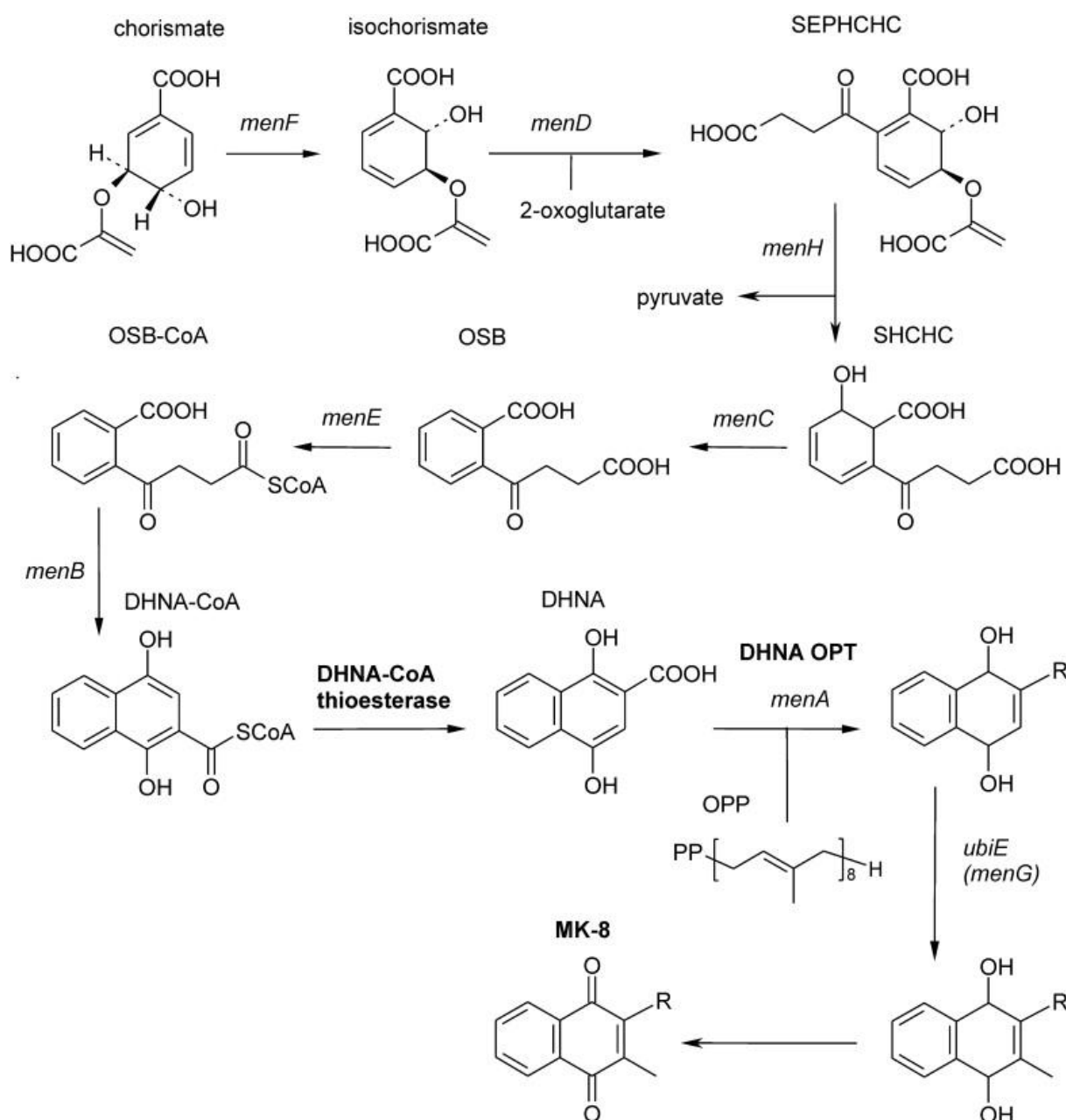


Figure 20 : Voie de biosynthèse de noyau naphtoquinone : DHNA, 1,4-dihydroxy-2-naphtoate; R, chaîne octaprényle; OSB, *o*-succinylbenzoate; SEPHCHC, 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-acide carboxylique; SHCHC, (1R, 6R)-2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-acide carboxylique; OPP, octaprényl

diphosphate; AdoMet, S-adenosylmethionine; AdoHcy, S-adenosylhomocysteine. D'après (Nowicka and Kruk 2010).

De nombreuses bactéries (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Streptomyces coelicolor* et *Thermus thermophilus*) sont capables de biosynthétiser MK alors qu'aucun homologue des gènes *men* n'est présent (sauf *menA*). Ainsi, la seconde voie de biosynthèse, appelée la voie de futilosine a été découverte récemment (Hiratsuka *et al.* 2008). Dans cette voie, 4 enzymes *mqn* (*mqnA-D*) sont nécessaires pour former le DHNA (figure 21).

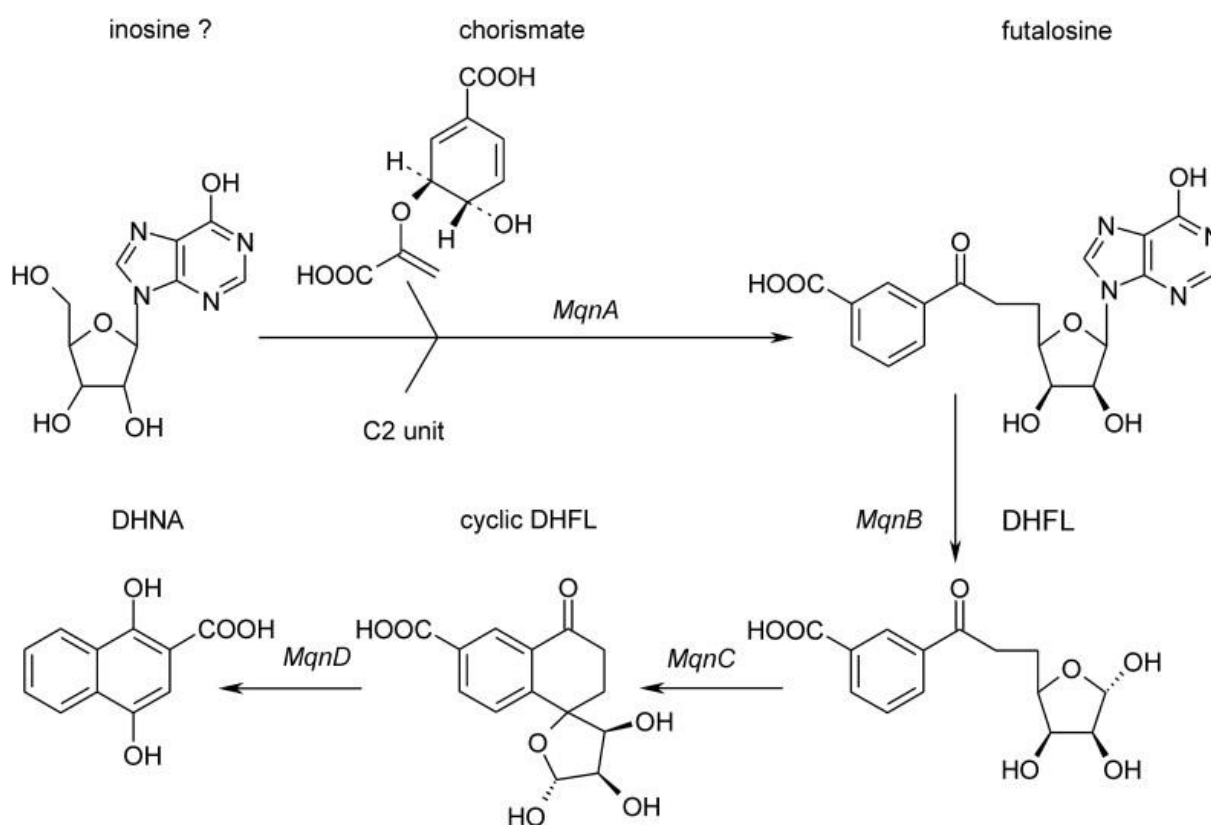


Figure 21 : Voie alternative de biosynthèse du noyau naphtoquinone : DHFL, dehypoxanthinylfutilosine. D'après (Nowicka and Kruk 2010).

UbiA et MenA appartiennent à la famille de polyprényltransférases. Alors que la réaction de prénylation de la tête polaire par MenA se fait tardivement dans la voie de biosynthèse de naphtoquinones (avant dernière étape), cette réaction intervient tôt dans la voie de biosynthèse de Q₈. Ceci implique que la plupart des intermédiaires de biosynthèse de MK sont hydrosolubles alors que ceux de la biosynthèse de Q₈ sont liposolubles et donc localisés dans la bicouche lipidique.

IV. L'organisation des protéines de biosynthèse de Q en complexe : conservée ou non ?

L'organisation supramoléculaire des protéines de biosynthèse de Q a été étudiée principalement chez *S. cerevisiae* et dans une moindre mesure chez *E. coli*. Des techniques biochimiques (Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) ; filtration sur gel et immunoprécipitation) ont permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe de biosynthèse de Q.

IV.1. Mise en évidence d'un complexe protéique chez *S. cerevisiae* :

Des expériences de protéolyse sur mitochondries isolées (par la protéinase K) ont établi que les protéines Coq sont situées dans la matrice mitochondriale et que la plupart d'entre elles sont regroupées en complexe soluble associé à la membrane interne mitochondriale (**Poon *et al.* 1999; Belogradov *et al.* 2001; Baba *et al.* 2004; Gin *et al.* 2003; Tran *et al.* 2006; Hsieh *et al.* 2007**). Coq2 est la seule protéine Coq de levure qui possède des domaines transmembranaires et elle se comporte comme une protéine membranaire intégrale (**Ashby *et al.* 1992**). Les intermédiaires de biosynthèse du coenzyme Q possédant la chaîne polyisoprényle sont hydrophobes et donc ancrés dans la membrane. Ainsi, la localisation des protéines Coq pose un problème d'accessibilité des intermédiaires à ces protéines pour que les différentes modifications du noyau aromatique puissent être effectuées.

IV.1.a. Les mutants Δcoq accumulent du HHB :

Les mutants de délétion des gènes codants pour les protéines allant de Coq3 à Coq9 accumulent principalement le même intermédiaire, le HHB, le produit de Coq2 (composé 2 sur la figure 12), au lieu des intermédiaires correspondants dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q. Ceci s'explique par le fait que la stabilité des protéines Coq4, Coq6, Coq7 et Coq9 est significativement diminuée dans les mitochondries isolées de mutants Δcoq (**Baba *et al.* 2004; Belogradov *et al.* 2001; Gin *et al.* 2005; Hsieh *et al.* 2007; Hsu *et al.* 2000; Tran *et al.* 2006**). Ainsi, la délétion d'un seul gène COQ entraîne l'absence de plusieurs protéines Coq et donc

l'inactivation de la voie de biosynthèse à plusieurs étapes, empêchant la formation de l'intermédiaire directement en amont du gène inactivé. De plus, il a été démontré que la présence d'une protéine Coq inactive (mutant ponctuel) n'est pas équivalent à l'absence de cette protéine causée par la délétion du gène. Par exemple, la surexpression d'UbiF d'*E. coli* rétablit la biosynthèse du coenzyme Q dans le mutant ponctuel *coq7* (E194K), mais pas dans le mutant $\Delta coq7$ (Tran *et al.* 2006). D'une manière similaire, la biosynthèse du coenzyme Q est rétablie dans les mutants ponctuels *coq5-2* et *coq5-5* (dans lesquels les niveaux protéiques de Coq3, Coq4 et Coq5 sont normaux) par la surexpression d'UbiE (l'homologue du Coq5) d'*E. coli* (Baba *et al.* 2004). Ce n'est pas le cas dans un mutant $\Delta coq5$. Par ailleurs, les protéines Coq3 et Coq7 sont stables dans le mutant ponctuel *coq4-1* (E226K), tandis qu'elles sont dégradées dans le mutant $\Delta coq4$ (Belogradov *et al.* 2001). Ainsi, la stabilité des protéines Coq dépend de la présence des autres protéines Coq. D'une manière intéressante, l'ajout de coenzyme Q₆ exogène entraîne la stabilisation des niveaux protéiques de Coq3 et Coq4 dans le mutant $\Delta coq7$ (Tran *et al.* 2006), suggérant que le coenzyme Q lui-même pourrait jouer un rôle dans la stabilité de l'assemblage supra-moléculaire des protéines Coq.

IV.1.b. La surexpression de Coq8 stabilise le complexe protéique :

Il a été démontré récemment par notre équipe que la surexpression de Coq8 entraînait la stabilisation de la plupart des protéines Coq dans les mutants Δcoq (Xie *et al.* 2012). Coq8 joue un rôle dans la phosphorylation de protéines Coq3, Coq5 et Coq7 (Xie *et al.* 2011). Nous avons mis en évidence que l'activité kinase de Coq8 était à la base de son rôle stabilisateur du complexe multiprotéique nécessaire à la biosynthèse de Q₆. Cette stabilisation des protéines Coq a pour conséquence d'entraîner l'accumulation d'intermédiaires diagnostiques de l'étape déficiente de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les mutants Δcoq . En effet, les intermédiaires accumulés DDMQ (composé 6, figure 12) et DMQ (composé 7, figure 12) par les mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ respectivement surexprimant Coq8 sont en accord avec l'implication démontrée de Coq5 dans la réaction de méthylation en C2 et de Coq7 dans l'étape d'hydroxylation en C6 (Xie *et al.* 2012).

IV.1.c. Caractérisation du complexe protéique :

Différentes méthodes biochimiques ont démontré l'existence d'un complexe multiprotéique de biosynthèse de Q₆. En 2005, Marbois *et al.* ont montré que les protéines Coq3, Coq4 et Coq6 coéluent à une taille de 700 kDa par filtration sur gel et que Coq3 et Coq4 co-migrent à une taille supérieure à 1000 kDa sur un gel BN-PAGE en utilisant des extraits mitochondriaux solubilisés avec la digitonine (figure 22) (Marbois *et al.* 2005). Plus tard en 2007, Tran et Clarke ont démontré que Coq2 co-migre avec Coq3, Coq4, Coq7 et Coq9 sur BN-PAGE et que Coq9 co-élue avec Coq3, Coq4, Coq5 et Coq8 par filtration sur gel (Tran *et al.* 2007). De plus, il a été démontré que la protéine Coq9-HA est co-immunoprécipitée avec les protéines Coq4, Coq5, Coq6 et Coq7 (Tran and Clarke 2007). Récemment, une nouvelle protéine Coq11 a été mise en évidence par le laboratoire de Catherine Clarke (Allan *et al.* 2015). Ces auteurs ont montré par des expériences de filtration sur gel que Coq11 co-élue avec Coq4, Coq5 et Coq7 et que Coq11 co-immunoprécipite avec Coq3, Coq6 et Coq9 grâce à des expériences de co-immunoprécipitation.

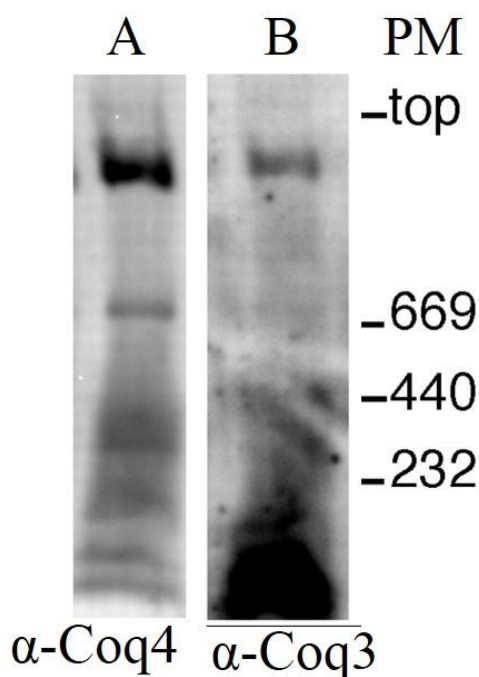


Figure 22 : Association de Coq3 et Coq4 dans un complexe de taille moléculaire supérieure à 1000 kDa : Analyse sur BN-PAGE des extraits mitochondriaux d'une souche WT solubilisés par la digitonine. Le signal dans A a été détecté par un anticorps polyclonal dirigé contre Coq4. Le signal dans B a été détecté par stripping de la même membrane de A et en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine Coq3. D'après (Marbois *et al.* 2005).

Tous ces résultats ont permis de confirmer la présence d'un complexe protéique (ou de plusieurs sous-complexes) regroupant les protéines Coq et de proposer un modèle de répartition de ces protéines au niveau de la membrane interne mitochondriale (figure 23).

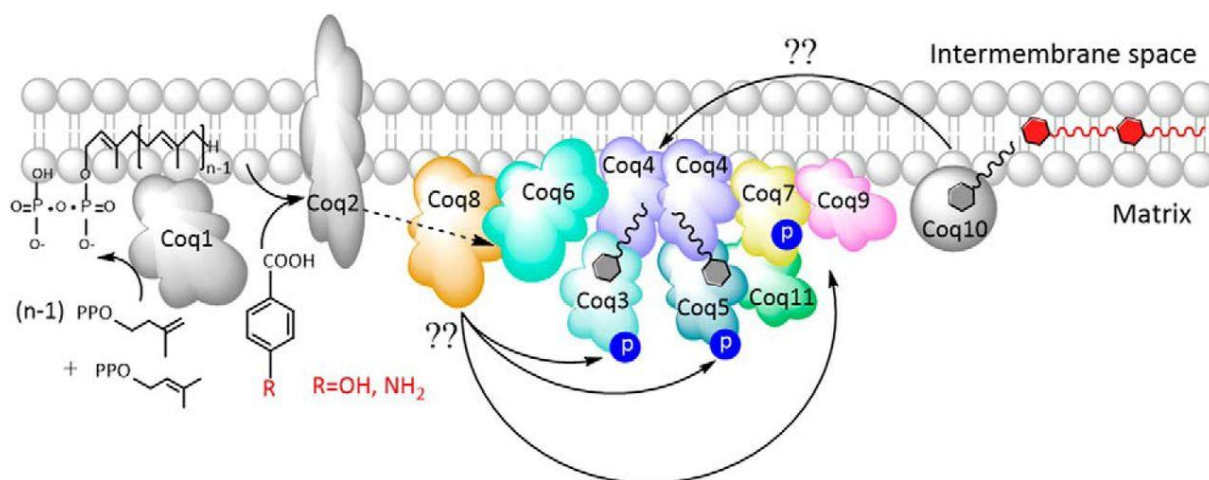


Figure 23 : Modèle de complexe protéique mitochondrial proposé chez *S. cerevisiae*. La stoechiométrie représentée dans ce modèle est théorique. Le coenzyme Q est localisé au milieu de la membrane interne mitochondriale (molécule rouge) alors que les intermédiaires de biosynthèse (molécules grises) sont liés à travers leur queue polyisoprényle par Coq4 et sont présentés aux différentes protéines pour assurer la modification de substituants. D'après (Allan *et al.* 2015).

Dans ce modèle, les 3 protéines Coq1, Coq2 et Coq10 ne sont pas montrés en association avec le complexe. Coq10 pourrait lier les intermédiaires de biosynthèse et fonctionner comme une protéine chaperone pour la biosynthèse *de novo* de Q (Allan *et al.* 2013). Coq8 est essentielle pour la phosphorylation de Coq3, Coq5 et Coq7 et se trouve en association avec Coq6 (Xie *et al.* 2011). Dans ce modèle, le rôle de Coq4 est hypothétique puisque la séquence d'acides aminés de Coq4 ne montre pas d'homologie significative avec des domaines connus ou avec des motifs de protéines qui présentent des activités enzymatiques connues. En fait, Rea *et al.* ont suggéré que Coq4 peut lier la queue polyisoprényle des intermédiaires de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ permettant ainsi la modification du noyau aromatique par les autres protéines Coq (Rea *et al.* 2010). Coq11 est en association avec Coq4, Coq5 et Coq7. L'analyse lipidique des éluats de co-précipitation montre l'association de Q₆ et de DMQ₆ avec le complexe (Marbois *et al.* 2005). Ce complexe pourrait aussi être ancré à la membrane et stabilisé par l'intermédiaire d'autres protéines non caractérisées et/ou des composants lipidiques comme la DMQ₆. Toutefois, le nombre de copies de chaque protéine est hypothétique car la stoechiométrie n'a pas été déterminée. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer la stoechiométrie des composants protéiques et des lipides du complexe, pour élucider la nature des associations à la membrane et pour identifier d'autres constituants potentiels.

IV.2. Mise en évidence d'un complexe protéique chez les mammifères :

Un complexe de biosynthèse de Q₁₀ chez les mammifères n'a jamais été décrit. Récemment, Lohman *et al.* ont démontré que la délétion de COQ9 entraîne une diminution de l'abondance des autres protéines Coq (Lohman *et al.* 2014). Cela suggère que la stabilité des protéines Coq humaines est interdépendante tout comme la situation rencontrée chez *S. cerevisiae*. De plus, la résolution de la structure cristallographique de Coq9 a révélé un site de liaison des lipides et sa purification après son expression hétérologue chez *E. coli* ou dans des germes de blé a démontré la copurification de plusieurs lipides (majoritairement phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylglycérol) ainsi que le coenzyme Q. Le rôle de Coq9 (qui n'a pas d'homologue chez *E. coli*) semble être limité à Coq7 puisqu'une souris dans laquelle Coq9 est partiellement inactivé accumule du DMQ₉, le substrat de Coq7 (Lohman *et al.* 2014; Garcia-Corzo *et al.* 2013). Ainsi, les auteurs proposent que l'interaction de Coq9 avec Coq7 est importante pour que Coq9 puisse présenter l'intermédiaire lipidique DMQ₉ à Coq7. Ces résultats pourraient aller dans le sens de présence d'un complexe protéique de biosynthèse de Q chez les mammifères.

IV.3. Mise en évidence d'un complexe protéique chez *E. coli* :

La présence d'un complexe de biosynthèse de Q chez *E. coli* a été beaucoup moins étudiée que chez *S. cerevisiae*. Seule une étude ancienne (Knoell 1979) documente la présence d'un complexe multiprotéique soluble de masse 2000 kDa capable de biosynthétiser Q₈, mais les composants de ce complexe ne sont pas identifiés. Dans cette étude, une souche sauvage d'*E. coli* a été cultivée dans des conditions anaérobies en présence de glycérol-fumarate comme source de carbone et de 4-HB marqué (4-hydroxy[¹⁴C]benzoate). Ces conditions favorisent l'accumulation d'OPP marqué (composé 3, figure 12) dont il est possible de suivre la conversion en Q₈ après exposition à l'air. La sonication du culot cellulaire suivie d'une ultracentrifugation à 40 000g du lysat permet de séparer la fraction soluble (surnageant) de la fraction membranaire (culot). Environ 50% de l'OPP a été détecté dans le surnageant. Une chromatographie sur gel de la fraction soluble a permis d'isoler une fraction de haut poids moléculaire contenant de l'OPP marqué (composé 3, figure 12). L'activité de cette fraction a été testée *in vitro* par addition de la SAM et du dioxygène et a montré que le pool d'OPP marqué est converti en Q₈ marqué. De plus, l'addition du triton X-100 inhibe la formation de Q₈ ce qui

indique que le complexe contenu dans cette fraction est stabilisé par des interactions hydrophobes (**Knoell 1979**).

Avant le début de la thèse, nos collaborateurs à Marseille (Laboratoire de Chimie Bactérienne, Equipe Barras) ont testé l'interaction des protéines Ubi entre elles par un système de double hybride bactérien (données non publiées).

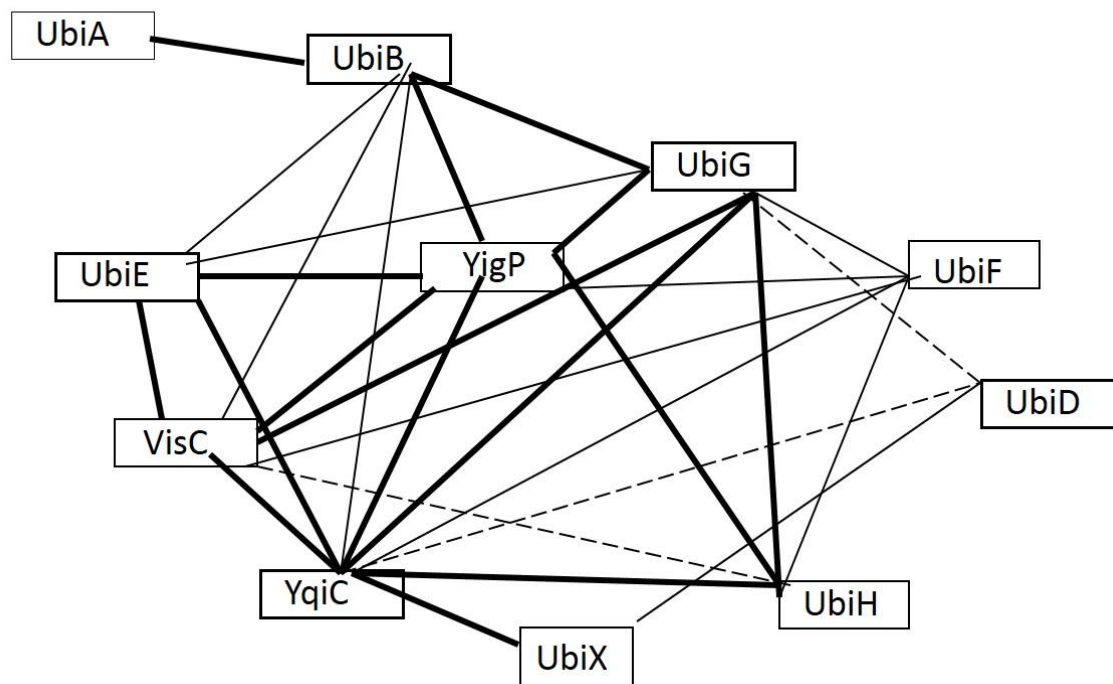


Figure 24 : Interaction des protéines Ubi par double hybride bactérien. Les traits épais, normaux et pointillés représentent une interaction dans les deux sens, dans un seul sens et faible, respectivement. Une interaction dans le double sens signifie que le domaine A de l'adénylate cyclase fusionné à la protéine 1 en N-ter interagit avec le domaine B de l'adénylate cyclase fusionné à la protéine 2 en N-ter et à l'inverse le domaine B-protéine 1 interagit avec le domaine A-protéine 2. Une interaction dans un seul sens signifie que l'une de ces constructions fonctionne.

Ce système de double hybride bactérien consiste à lier une protéine Ubi (protéine 1) à un domaine (A) de l'adénylate cyclase (en N-ter

) et une autre protéine Ubi (protéine 2) à l'autre domaine (B) de l'adénylate cyclase. Le test est effectué chez la bactérie *E. coli* directement. L'interaction entre les domaines A et B induit l'activité de l'adénylate cyclase visualisable grâce à la production de l'AMPc et traduit une interaction entre les protéines Ubi (1 et 2). Les résultats obtenus montrent bien que la plupart des protéines Ubi interagissent (figure 24). Cependant, ce type d'expérience ne permet pas d'établir si l'interaction entre les différentes protéines est directe ou indirecte (médiée par une autre protéine Ubi par exemple).

V. But du travail :

Le sujet de thèse est formé de deux axes majeurs :

- Elucidation du rôle de nouveaux acteurs de biosynthèse de Q₈ chez la bactérie *Escherichia coli*.
- Caractérisation d'un complexe multiprotéique de biosynthèse de Q₈.

Ce projet est développé en collaboration avec le laboratoire de Chimie Bactérienne à Marseille (essentiellement pour la génétique et la biologie cellulaire) et le laboratoire de Chimie des Processus Biologiques au Collège de France à Paris (pour les études structurales et fonctionnelles des protéines purifiées).

D'après le schéma de la figure 12, les enzymes responsables de trois réactions d'hydroxylation semblent être connues : hydroxylations en C1, C5 et C6 (réactions e,g et i). UbiH et UbiF possèdent des motifs caractéristiques des monooxygénases à Flavine (**Kwon, Kotsakis, et al. 2000**). La fonction de monooxygénation attribuée à UbiB est discutable car UbiB n'a pas d'homologie de séquence avec des monooxygénases mais avec des kinases. Nous pensions donc qu'il existe une monooxygénase non identifiée qui catalyse l'hydroxylation en C5. Le **chapitre I** rapporte les différents éléments qui nous ont permis de démontrer que VisC, renommée UbiI dans la suite de ce manuscrit est une monooxygénase à flavine qui catalyse l'hydroxylation en C5. Ce travail a donné lieu à une publication dans JBC en 2013.

En collaboration avec le groupe de Frédéric Barras à Marseille, nous avons trouvé que la mutation du gène *yigP*, situé dans un opéron entre *ubiB* et *ubiE*, diminue très fortement la biosynthèse aérobie de Q₈. D'autre part, dans une étude à grande échelle, les souches *ΔyqiC* et *ΔubiI* montrent une sensibilité commune à de nombreux produits chimiques (même chimiotype) (**Nichols et al. 2011**). Ces corrélations reflètent souvent une implication des gènes dans un même processus cellulaire et nous avons en effet pu démontrer que la protéine YqiC est impliquée dans la biosynthèse aérobie de Q₈. Le **chapitre II** décrit l'effet de la délétion d'*yigP* (renommée *ubiJ*) et d'*yqiC* (renommée *ubiK*) sur la biosynthèse de Q₈. La localisation cellulaire et le degré d'association à la membrane des protéines UbiJ et YqiC ont été aussi étudiés suite à la mise au point du fractionnement cellulaire décrite aussi dans cette partie.

La deuxième partie de la thèse est consacrée à l'étude du complexe de biosynthèse de Q₈ chez *E. coli*. Comme je l'ai précédemment évoqué, l'existence d'un complexe de biosynthèse de Q a été démontrée uniquement chez la levure *S. cerevisiae* (Tran and Clarke 2007; Allan *et al.* 2015). Néanmoins, nous pensons que l'existence d'un tel complexe chez d'autres organismes qui produisent Q est rationnelle. En effet, les intermédiaires de biosynthèse de Q en aval de la réaction catalysée par la polyprényl transférase Coq2/UbiA sont très hydrophobes du fait de la chaîne polyprényl et sont donc vraisemblablement enchâssés dans la membrane. La plupart des protéines de biosynthèse de Q ne présentent pas de domaine trans-membranaire, mis à part Coq2/UbiA. Ainsi, il serait logique que ces protéines « solubles » soient associées à la membrane grâce notamment à des interactions avec la polyprényl transférase afin d'avoir accès à leur substrat : les intermédiaires de biosynthèse de Q qui sont localisés dans la membrane. La mise en évidence d'un complexe impliquant plusieurs protéines Ubi est rapportée dans le **chapitre III**. Les analyses par BN-PAGE effectuées en utilisant plusieurs souches contenant une protéine Ubi étiquetée par un tag SPA sont décrites dans ce chapitre. De plus, les résultats obtenus par Western Blot du gel BN-PAGE sont aussi confirmés par analyse protéomique des fragments de gel BN-PAGE. L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre nous a permis de proposer un modèle de répartition des protéines Ubi au sein de la membrane plasmique.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la biosynthèse de Q dans des conditions de cultures anaérobies. Nos résultats montrent l'existence « d'hydroxylases anaérobies », inconnues à ce jour, qui remplacent les hydroxylases aérobies UbiH, UbiI et UbiF. Dans le **chapitre IV**, je détaille l'approche phylogénétique dont nous sommes partis pour identifier un gène important pour la biosynthèse de Q spécifiquement en conditions anaérobies. Nous avons également cherché à préciser la source des groupements hydroxyles qui sont ajoutés lors des réactions d'hydroxylation anaérobies.

Matériels et méthodes

A- Matériels

1- Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes construites par Laurent Loiseau (LCB, Marseille) et utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau ci-dessous :

Souche	Génotype
MG1655	F-lambda- <i>ilvG-rfb-50 rph-1</i>
<i>ΔubiI</i>	MG1655 <i>ΔubiI</i> :: kan
<i>ΔubiJ</i>	MG1655 <i>ΔubiJ</i> :: kan
<i>ΔubiK</i>	MG1655 <i>ΔubiK</i> :: kan
<i>ΔubiH</i>	MG1655 <i>ΔubiH</i> :: kan
<i>ΔubiE</i>	MG1655 <i>ΔubiE</i> :: kan
<i>ΔubiF</i>	MG1655 <i>ΔubiF</i> :: Kan
<i>ΔubiEΔubiI</i>	MG1655 <i>ΔubiIE</i> :: kan <i>ΔubiI</i>
<i>ΔubiFΔubiI</i>	MG1655 <i>ΔubiIF</i> :: kan <i>ΔubiI</i>
Ubi-SPA Ubi-(A, B, C, E, F, G, H, I, J, K, X)-SPA et YhbT-SPA	MG1655 <i>ubi-SPA</i> :: kan MG1655 <i>yhbT-SPA</i> :: kan
Ubi-SPA <i>ΔubiK</i> Ubi-(I, H, F, J)-SPA <i>ΔubiK</i>	MG1655 <i>ΔubiK ubi-SPA</i> :: kan
Ubi-SPA <i>ΔubiJ</i> Ubi-(I, H, F)-SPA <i>ΔubiJ</i>	MG1655 <i>ΔubiJ ubi-SPA</i> :: kan
<i>ΔubiIΔubiK</i>	MG1655 <i>ΔygiF</i> :: Cat <i>ΔubiIΔubiK</i> :: kan
<i>ΔubiEΔubiK</i>	MG1655 <i>ΔygiF</i> :: Cat <i>ΔubiEΔubiK</i> :: kan
<i>ΔubiFΔubiK</i>	MG1655 <i>ΔygiF</i> :: Cat <i>ΔubiFΔubiK</i> :: kan
<i>ΔubiCΔubiK</i>	MG1655 <i>ΔygiF</i> :: Cat <i>ΔubiCΔubiK</i> :: kan
<i>ΔyhbT</i>	MG1655 <i>ΔyhbT</i> :: kan
<i>ΔyhbS</i>	MG1655 <i>ΔyhbS</i> :: kan

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées. kan : cassette de résistance à la kanamycine ; Cat : cassette de résistance au chloramphénicol.

Le tag SPA est la répétition de trois séquences flag séparées de CBP (calmodulin binding protein) par une séquence de clivage à la TEV. Ce tag est de taille 8 kDa, inséré directement dans le chromosome du côté 3' du gène.

2- souche de levure

Souche	Génotype	Origine
$\Delta coq6$	MATα ; his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 COQ6::kan MX4	Euroscarf

Tableau 2 : Souche de levure utilisée provenant d'Euroscarf (European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis).

3- Vecteurs plasmidiques utilisés

Tous les plasmides ont été construits par Laurent Loiseau et Laurent Aussel (*S.typhimurium*) au LCB à Marseille et sont listés dans le tableau ci-dessous :

Nom du vecteur	Organisme hôte	Caractéristiques	Origine
pRS423+COQ8	<i>S. cerevisiae</i>	pRS423 contenant le gène COQ8 de <i>S. cerevisiae</i> avec son propre promoteur et terminateur cloné en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et XhoI.	Ce travail (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)
pRS416+COQ6	<i>S. cerevisiae</i>	pRS416 contenant le gène COQ6 de <i>S. cerevisiae</i> avec le promoteur Met25 cloné en utilisant les enzymes de restriction XbaI et XhoI.	Ce travail (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)
pRS426 TDH3-ubiI	<i>S. cerevisiae</i>	ubiI d' <i>E. coli</i> précédée d'une préséquence F1 β de <i>Neurospora crassa</i>	Ce travail (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)

pBAD24	<i>E. coli</i>	vecteur d'expression. sélection par ampicilline	(Guzman <i>et al.</i> 1995)
ptrC99A	<i>E. coli</i>	vecteur d'expression. sélection par ampicilline	Amersham
pET-ubiI-his6	<i>E. coli</i>	L'ORF d' <i>ubiI</i> d' <i>E. coli</i> avec une séquence 6-His à l'extrémité 3'. Sélection par Ampicilline	Ce travail (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)
pBAD-ubiI	<i>E. coli</i>	<i>ubiI</i> d' <i>E. coli</i> cloné dans le vecteur pBAD24. Induction par Arabinose et sélection par ampicilline	Ce travail (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)
ptrC-ubiI _{tr}	<i>E. coli</i>	<i>ubiI</i> tronquée (sans les résidus 366-400) cloné dans le vecteur ptrC99a. Sélection par ampicilline.	Ce travail (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)
pBAD-ubiI[G301AN303D]	<i>E. coli</i>	<i>ubiI</i> d' <i>E. coli</i> avec des mutations G301A-N303D clonée dans un vecteur pBAD24. Induction par arabinose et sélection par ampicilline.	Ce travail (Hajj Chehade <i>et al.</i> 2013)
<i>pubiJ</i>	<i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i>	pBAD24 contenant le gène <i>ubiJ</i> d' <i>E. coli</i> ou de <i>Salmonella</i> (201 acides aminés) sélection par ampicilline	Ce travail (Aussel, Loiseau, <i>et al.</i> 2014)
<i>pubiJ</i> N-ter	<i>S. Typhimurium</i>	pBAD24 exprimant les 120 acides aminés localisés en N-ter d'UbiJ; sélection par ampicilline	Ce travail (Aussel, Loiseau, <i>et al.</i> 2014)

<i>pubiJ</i> 63C	<i>S. Typhimurium</i>	pBAD24 exprimant les 63 derniers acides aminés localisés en C-ter ; sélection par ampicilline	Ce travail (Aussel, Loiseau, et al. 2014)
<i>pubiJ</i> 50C	<i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i>	pBAD24 exprimant les 50 derniers acides aminés localisés en C-ter ; sélection par ampicilline	Ce travail (Aussel, Loiseau, et al. 2014)
<i>pubiJ</i> 50C+1	<i>S. Typhimurium</i>	pBAD24 exprimant les 63 derniers acides aminés localisés en C-ter avec modification du cadre de lecture d'un seul nucléotide après la méthionine ; sélection par ampicilline	Ce travail (Aussel, Loiseau, et al. 2014)
<i>pubiJ</i> 50C+2	<i>S. Typhimurium</i>	pBAD24 exprimant les 63 derniers acides aminés localisés en C-ter avec modification du cadre de lecture de deux nucléotides après la méthionine ; sélection par ampicilline	Ce travail (Aussel, Loiseau, et al. 2014)
<i>pubiJ</i> 35C	<i>S. Typhimurium</i>	pBAD24 exprimant les 35 derniers acides aminés localisés en C-ter ; sélection par ampicilline	Ce travail (Aussel, Loiseau, et al. 2014)
<i>pubiK</i>	<i>E. coli</i>	ptrC99A contenant le gène <i>ubiK</i> d' <i>E. coli</i> Sélection par Ampicilline	Ce travail
<i>pyhbT</i>	<i>E. coli</i>	ptrC99A contenant le gène <i>yhbT</i> d' <i>E. coli</i> Sélection par Ampicilline	Ce travail

Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés dans la thèse.

4- Milieux de culture

4-a- Culture d'*E.coli*

Différents milieux de culture sont utilisés :

- Milieu riche liquide LB (Luria Broth : 10g/L tryptone, 5g/L d'extraits de levure et 10g/L de NaCl). De l'arabinose (0,2%) a été ajouté dans ce milieu pour l'induction des gènes soumis au contrôle du promoteur du vecteur pBAD.
- Milieu solide LB-agar (10g/L tryptone, 5g/L d'extraits de levure, 10g/L de NaCl et 15g/L agar).
- Culture en présence d'eau marquée $H_2^{18}O$: Du LB est dissous dans 1 mL d'eau marquée puis stérilisé par filtration. Ensuite, le milieu a été congelé puis rentré dans une boîte à gants sous atmosphère d'azote.
- Les antibiotiques : kanamycine, ampicilline et chloramphenicol sont dilués à 1/1000 à partir d'une solution stock à 0.1 M conservée à -20°C et stérilisée par filtration (kan, amp). Les stocks de kanamycine et de l'ampicilline sont préparés par dissolution de la poudre dans l'eau, le chloramphénicol est préparé dans de l'éthanol. Ces antibiotiques sont utilisés pour assurer la sélection des bactéries et des mutants de délétion construits avec un gène de résistance à l'antibiotique correspondant.

4-b- Culture de *S. cerevisiae*

- Milieu synthétique liquide YNB sans pABA sans folate (0.17% Yeast Nitrogen Base (YNB), 0.5% sulfate d'ammonium $((NH_4)_2SO_4)$ qui est autoclavé puis nous ajoutons les solutions stériles suivantes : 10 μM de 4-HB (sigma), 2% galactose et 0,4% glucose et les acides aminés et nucléotides (en quantité telle que décrite dans (Sherman 2002)) pour lesquels la souche est auxotrophe. Ce milieu a été utilisé pour la culture de la souche $\Delta coq6$ transformée avec les plasmides portant les gènes COQ8 et/ou COQ6 et *ubiL*.

- Milieu synthétique solide avec la même composition que le milieu liquide ci-dessus auquel est ajouté du bacto-agar (15g/L), 10 μ M du 4-HB et 2% glucose (milieu fermentatif) ou 2% lactate-glycérol (milieu respiratoire). Ce milieu a été utilisé pour les tests de dilution en série pour évaluer la croissance du mutant *coq6* transformé ou non par UbiI+Coq8 (chapitre I).

5- conditions de culture :

A partir d'une préculture sur la nuit, les cellules sont inoculées à une $DO_{600}=0,05$. Les cultures en aérobie ont été arrêtées en phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=1-1,5$) sauf pour les cultures utilisées pour le fractionnement cellulaire (culture arrêtée en fin de phase exponentielle $DO_{600}=1,5-2$) et les cultures en anaérobie ont été arrêtées en phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=1$). Les tubes en verre ou les falcons ont été mis sur glace pendant environ 30 minutes puis le milieu a été centrifugé afin de récupérer le culot cellulaire.

- Les cultures en aérobie sont effectuées dans des tubes en verre de 15 cm de longueur et de 2 cm de diamètre dans 5 mL de milieu et sont incubées à 37°C sous agitation 200 rpm.
- Les cultures en aérobie des souches Ubi-SPA utilisées pour le fractionnement et les expériences de BN-PAGE sont effectuées dans des flasques Erlenmeyer (erlens) de 2L contenant 1L du milieu riche LB à 37°C sous agitation 200 rpm.
- Les cultures en anaérobie sont faites dans des tubes falcons de 15 mL remplis totalement et bien fermés. Les tubes sont incubés dans une étuve à 37°C sans agitation. L'oxygène dissout dans le milieu est rapidement consommé en début de culture, ce qui conduit à l'obtention de conditions anaérobies.
- Culture anaérobique en présence d'eau marquée : du LB est dissout soit dans 2 mL d'eau marquée, soit dans 2 mL d'eau non marquée. Les milieux ont été congelés avec de l'azote liquide et dégazés dans le sac à vide de la boîte à gants (BAG) par exposition à trois cycles d'azote effectués manuellement à l'aide d'un manovacuumètre à aiguille (0-

1 bar). Ensuite, les milieux ont été rentrés dans la BAG et dégazés toute la nuit en laissant les tubes ouverts (la culture est alors strictement anaérobie dès le début de l'expérience). 1,5 mL de cellules cultivées en anaérobiose sont centrifugées et la grande partie du surnageant est jetée à l'intérieur de la boîte à gants. Le culot est repris dans la partie du surnageant qui reste (environ 40 µL). Les cultures démarrent avec 4 µL d'inoculum. Les cultures anaérobies sont incubées dans un thermomixer à 37°C sans agitation à l'intérieur de la BAG pendant une journée (≈9h). Les cultures aérobies sont faites dans des tubes en verre sous agitation à 37°C hors de la boîte à gants.

- Purification de DQ₈ : La souche *ΔubiE* a été cultivée dans 2 erlens de 2L totalement remplis et bien fermés par des bouchons et filmés par du Parafilm pour empêcher l'entrée de l'air. La culture se fait sans agitation à 37°C pendant une journée (≈9h) et arrêtés à un DO₆₀₀=2.
- Purification de 4-HP₈ : la souche *ΔubiI* a été cultivée en milieu LB dans un fermenteur de 12L (mode d'alimentation par Batch) à 37°C sous agitation de 450 rpm.
- Les cultures de levures ont été effectuées dans des erlens de 50 mL contenant 10 mL de milieu de culture à 30°C sous agitation 200 rpm.

6- Anticorps utilisés

- Anticorps primaires : Anti-SPA (monoclonal) (Sigma) produit chez la souris reconnaît la séquence flag des protéines Ubi-SPA et utilisé à la dilution de 1/3000 ; anti-RpoA (don du Prof. Dominique Schneider) produit chez la souris reconnaît la protéine soluble RpoA et utilisé à la dilution de 1/2000 ; anti-NikA (don du Dr. Christine Cavazza) produit chez le lapin, reconnaît la protéine périplasmique exprimée en anaérobiose NikA et utilisé à la dilution de 1/3000 ; anti-LamB (don du Prof. Dominique Schneider) produit chez le lapin, reconnaît la protéine membranaire LamB et utilisé à la dilution de 1/2000.
- Anticorps secondaires : Nous avons utilisé un anticorps anti IgG de souris (pour anti-SPA et anti-RpoA) et un anti-IgG de lapin (pour anti-LamB et anti-NikA). Ces deux

anticorps sont couplés à la peroxydase de Raifort (HRP) et sont utilisés en western blot à la dilution 1/5000.

B-Méthodes

1- Préparation des fractions membranaires des souches Ubi-SPA par fractionnement cellulaire

La souche UbiK-SPA a été cultivée dans 1L de milieu riche LB. A la fin de la phase exponentielle (DO=2), les cellules ont été récoltées par centrifugation du milieu à 5000 g, à 4°C pendant 10 minutes. Le culot cellulaire a été ensuite repris dans quelques mL d'eau froide pour faire un lavage et une nouvelle centrifugation a été faite (identique à la première). Le culot a été ensuite repris dans 30 mL de l'un des tampons de lyse décrits dans le tableau ci-dessous :

Tampons	Tampon 1	Tampon 2	Tampon 3	Tampon 4
composition	50 mM Imidazole /HCl ; pH=7 50 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF 250 mM Sucrose	50 mM Imidazole /HCl ; pH=7 50 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF	50 mM Tris HCl pH=8 10% glycérol 1 mM MgSO ₄ 1 mM PMSF	50 mM Bis Tris pH=7 1 mM PMSF
Référence	Adapté de (Wittig <i>et al.</i> 2006)	(Wittig <i>et al.</i> 2006)	(Papanastasiou <i>et al.</i> 2013)	Adapté de (Guiral <i>et al.</i> 2009)

Tableau 4 : Composition des tampons de lyse utilisés pour lyser les cellules et effectuer le fractionnement cellulaire.

La lyse des cellules se fait par presse de FRENCH comme suit : la suspension bactérienne est chargée dans la chambre de compression (35 mL) à 4°C. Les cellules sont ensuite très fortement comprimées avec une pression de 16000 psi qui est appliquée à l'aide d'un vérin hydraulique puis sont ensuite libérées au travers d'un orifice de faible diamètre. Cette étape entraîne une variation de pression violente qui permet de lyser très efficacement les cellules. Les cellules lysées sont récupérées dans un tube falcon sur glace. A l'issue de la lyse, les débris ont été

éliminées par centrifugation du lysat à 4°C à 4000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est prélevé puis fractionné par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1h à 4°C:

- Le culot représentant la fraction membranaire a été repris dans 2 mL du même tampon de lyse pour les préparations 1, 2 et 3 ou 50 mM Bis Tris, 750 mM acide Amino-caproïque et 0,5 mM EDTA dans le cas de la préparation 4. La préparation est divisée en aliquots de 100 µL qui sont congelés par de l'azote liquide puis stockés à -80 °C jusqu'au jour d'utilisation.
- 15% de glycérol est ajouté au surnageant représentant la fraction soluble puis des aliquots de 100 µl sont congelés dans l'azote liquide et stockés à -80 °C jusqu'au jour d'utilisation.

A l'issue des tests effectués avec la souche UbiK-SPA (voir figure 35, chapitre II), le tampon 1 a été utilisé pour la préparation des fractions membranaires et de fractions solubles de toutes les souches Ubi-SPA. Ces fractions ont été utilisées pour l'évaluation de la localisation cellulaire des protéines Ubi (chapitres II et III), ainsi que pour la caractérisation du complexe multiprotéique par BN-PAGE (chapitre III).

Le dosage de protéines dans les deux fractions a été fait par la méthode de BCA. Typiquement, des concentrations de l'ordre de 8-10 mg/mL et 5-6 mg/mL ont été obtenues pour les fractions membranaires et solubles des souches Ubi-SPA et Ubi-SPA $\Delta ubiK$ respectivement. Des concentrations de l'ordre de 3-4 mg/mL ont été obtenues pour les fractions solubles des souches Ubi-SPA $\Delta ubiJ$.

2- Solubilisation de protéines Ubi membranaires

80 µL de fraction membranaire de la souche Ubi-SPA ont été incubés en présence de 1%, 2% ou 3% (v/v) d'une solution stock de Dodécyl-Maltoside (DDM) à 10% (m/v) ou en présence de 2,6% ou 3,9% (v/v) d'une solution stock de digitonine à 5% (m/v). L'incubation est effectuée pendant 1h à 4°C avec agitation modérée manuelle toutes les 10 minutes. Ensuite, une ultracentrifugation est effectuée dans des microtubes à 100 000 g pendant 1h à 4°C. 10 µL de surnageant correspondant aux protéines solubilisées est repris dans 40 µL du bleu de Laemmli pour analyse sur gel SDS-PAGE ou 2,5 µL du tampon du dépôt natif pour analyse sur gel BN-PAGE. La formule de ces deux tampons est indiquée dans le tableau ci-dessous :

Bleu de Laemmli (1X)	Tampon du dépôt natif (1X) commercial
1 mL Tris HCl, pH=6,8	50 mM Tampon BisTris, pH=7,2
2 mL DTT (0,1 M)	50 mM NaCl
4 mL SDS à 10 %	10% Glycérol
200 µL de bleu de bromophénol 0,5%	0,001% Rouge Ponceau
2 mL glycérol	
q.s.p. 10 mL d'eau distillée	

Tableau 5 : Composition des tampons de dépôt utilisés pour reprendre les cellules, les membranes ou les fractions solubles afin de les analyser sur gels SDS ou BN-PAGE.

Après élimination du surnageant, le culot membranaire résiduel (fraction non solubilisée) a été repris dans 40 µL du bleu de Laemmli. Ensuite 10 µL de ce mélange a été dissous dans 40 µL du Bleu de Laemmli afin d'analyser sur SDS-PAGE des quantités équivalentes du culot membranaire résiduel et de membranes solubilisées.

3- Analyse du degré d'association de protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA à la membrane

100 µL de membranes ont été incubés en présence de l'un de produits suivants : NaCl (500 mM), DDM (1% v/v), carbonate de potassium (100 mM) ou EDTA (100 mM). L'incubation a été faite à 4°C pendant une heure sous agitation modérée en utilisant des petits barreaux aimantés. La fraction soluble (surnageant) et la fraction membranaire (culot) sont ensuite séparées par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1h à 4°C. Les fractions sont ensuite analysées en SDS-PAGE et western-blot.

4- Gradient de sucrose

Les membranes internes et externes ont été séparées sur gradient de sucrose de 6 couches (30%-35%-40%-45%-50%-55%) (m/v). Le sucrose a été ajouté à 1 mL du tampon 2 (10X) et 2 mL d'eau froide pour assurer la dissolution puis de l'eau distillée a été ajoutée à une quantité

suffisante pour obtenir 10 mL (1X de concentration finale du tampon). Le gradient de sucrose a été coulé avec une pipette pasteur en déposant 0,5 mL de la solution de 55% de sucrose puis 1,5 mL des solutions 50%-30% dans des tubes spéciaux en polyallomère (volume maximal 13,2 mL ; Référence 331372, Beckman Coulter). 1 mL de la fraction membranaire a été déposé au sommet de ce gradient de sucrose puis les tubes ont été centrifugés à 210000 g pendant 16h à 4°C en utilisant un rotor à base mobile (Swing rotor, SW41Ti, Beckman Coulter). A l'issue de l'ultracentrifugation, la membrane externe migre dans les couches les plus riches en sucrose (45-55%) à cause de son contenu très élevé en protéines alors que la membrane interne migre dans les couches les moins riches en sucrose (30-35%). Les deux membranes ont été récoltées, diluées 4 fois dans le tampon 2 (1X) puis centrifugées à 16000 g pendant 1h à 4°C. Le culot a été repris dans 100 µL du tampon 1 et un dosage de protéines a été effectué par mesure de l'absorbance à 280 nm (spectrophotomètre Nanodrop Lite, Thermo Scientific). Une quantité équivalente à 20 µg a été analysée par SDS-PAGE et WB.

5- Préparation des extraits cellulaires totaux

1 mL de cellules en phase stationnaire de croissance sont centrifugées et le culot cellulaire est repris dans 1 mL du tampon de Laemmli (voir description dans le tableau 5).

6- Electrophorèse sur gel SDS-PAGE et immunodétection sur membrane de nitrocellulose

6-a- Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), selon leur poids moléculaire. Les protéines de faible poids moléculaire migrent plus loin. La taille apparente des protéines analysées est déterminée en se référant à un marqueur de poids moléculaire (Euromedex). Comme décrit ci-dessus, les échantillons sont additionnés d'une solution de tampon dénaturant (Bleu de Laemmli), et portés à ébullition pendant 10 min. Ce tampon contient du SDS, détergent anionique qui dénature les protéines et les charge négativement, ainsi que du DTT, agent réducteur qui rompt les ponts disulfures des protéines. L'ébullition favorise la désagrégation et la dénaturation des protéines. Les échantillons ont été déposés sur gel SDS-PAGE précoulé (Mini-PROTEAN® TGX™, Bio-

Rad) contenant 12% d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide. La migration est réalisée à 200 V dans le tampon contenant 25 mM Tris pH 8,3, glycine 192 mM et SDS 1% (v/v) et est arrêtée au bout de 25 minutes lorsque le front de migration (visualisé par le bleu de bromophénol) atteint la limite inférieure du gel. Le gel est ensuite soumis à un électrotransfert pour une analyse des protéines par Western-Blot.

6-b- Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose :

L'électrotransfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Bio-Rad). Le transfert est effectué pendant 75 min à 200V et une intensité de 150 mA dans le tampon contenant du Tris 25 mM pH 8,1, glycine 192 mM, éthanol 20% et SDS 0,01% dans une cuve Transblot (Bio-Rad) maintenue dans la glace.

6-c- Immunodétection des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant 45 minutes dans du tampon PBST+lait (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 136 mM et KCl 2,7 mM ; pH=7,1 et contenant 0,5% de Tween 20 et du lait en poudre à 50 g/L). Les protéines du lait se fixent et saturent les sites qui ne contiennent pas de protéines sur la membrane de transfert. Après saturation, la membrane est lavée trois fois avec du PBST puis incubée dans du PBST avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C.

Le lendemain et après trois lavages de 5 minutes dans du PBST, la membrane est incubée pendant 1,5 h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Elle est ensuite lavée trois fois pendant 5 min dans du PBST.

La présence des protéines reconnues par les anticorps est ensuite révélée par la détection de l'activité de la HRP grâce au kit Chemiluminescent reagent (Covalab). La HRP catalyse l'oxydation du luminol en présence d'eau oxygénée. Le retour du luminol à son état stable (forme réduite) permet l'émission d'une lumière visualisée par l'appareil Fusion Fx7 (Vilber).

Dans le cas où la même membrane est exposée à plusieurs anticorps primaires, elle est exposée à un tampon de stripping (0,2 M acide acétique et 6M chlorure de guanidinium) pendant 1

heure, suivie par un lavage au PBST pendant 15 minutes et une saturation par PBST+lait pendant 45 min.

7- Electrophorèse sur gel BN-PAGE et immunodétection sur membrane PVDF

7-a- Système BN-PAGE

Les analyses par 1D-BN-PAGE / 2D-SDS-PAGE ont été utilisées par plusieurs groupes pour analyser les complexes protéiques membranaires ou solubles (**Lasserre *et al.* 2006; Pan *et al.* 2011; Stenberg *et al.* 2005**). Le système BN-PAGE que j'ai utilisé est commercialisé par Life technologies ©. Il est formé de 2 chambres : la chambre inférieure contient le tampon d'anode et la chambre supérieure contient le tampon de cathode (figure 25A). La composition de ces tampons est donnée dans le tableau ci-dessous :

Tampon d'anode commercial	Tampon de cathode
50 mM BisTris 50 mM Tricine pH 6,8	50 mM tricine 7,5 mM Imidazole 0,02% de bleu de coomassie G-250 (Sigma) pH=7 (Wittig <i>et al.</i> 2006)

Tableau 6 : Composition des tampons d'anode et de cathode utilisés dans le système BN-PAGE.

Le tampon de cathode est riche en bleu de Coomassie d'où la coloration bleue. Le bleu de Coomassie confère la charge négative aux protéines pour qu'elles puissent migrer de la cathode à l'anode. La technique BN-PAGE diffère de la technique CN-PAGE (Clear Native-PAGE) par le fait que les protéines migrent en 1^{ère} dimension en fonction de leur point isoélectrique dans CN-PAGE, tandis qu'en BN-PAGE, les protéines migrent en fonction de leur taille moléculaire. Le BN-PAGE permet de conserver l'intégrité des complexes protéiques et de visualiser ceux dont la masse moléculaire est de l'ordre de 100 kDa-1MDa (figure 25B). Par western blot avec un anticorps anti-flag, un signal est détecté en 1^{ère} dimension (exemple d'UbiK-SPA représenté dans la figure 25B). Une analyse en seconde dimension (SDS-PAGE) suivie d'un western blot

avec le même anticorps permet de vérifier que le signal observé en première dimension est corrélé à un signal en deuxième dimension à la taille monomérique de la protéine étudiée, validant ainsi la spécificité des signaux observés. Concrètement, la piste obtenue après migration en première dimension est positionnée horizontalement au sommet d'un gel SDS-PAGE (figure 25C). La migration s'effectue en parallèle à celle d'un marqueur de poids moléculaire et la révélation par western-blot permet de préciser la taille monomérique de la protéine pour laquelle un signal était détecté en 1^{ère} dimension (figure 25C).

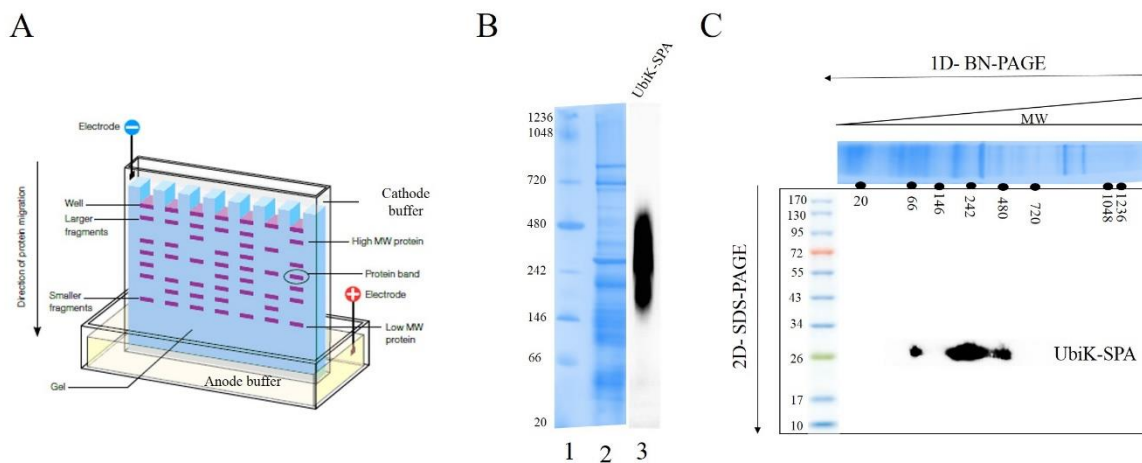


Figure 25: Système BN-PAGE : (A) Le système BN-PAGE est formé de 2 chambres inférieure et supérieure contenant les tampons anode et cathode respectivement. Le bleu de coomassie contenu dans le tampon de cathode confère la charge aux protéines pour la migration de la cathode vers l'anode. (B) Photo du gel (3-12% d'acrylamide) prise à la fin de la migration et après décoloration avec 20% de méthanol et 5% d'acide acétique (piste 2). Les poids moléculaires des protéines contrôles sont indiqués (20 kDa-1236 kDa) (piste 1). L'exemple d'un signal détecté pour UbiK-SPA par western blot avec un anticorps anti-SPA est montré dans la piste 3 (C) Représentation schématisée de la 2^{ème} dimension en gel SDS PAGE. Le fragment du gel BN-PAGE de la 1^{ère} dimension est positionné horizontalement au sommet d'un gel SDS PAGE. La migration se fait en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire (10kDa-170 kDa). L'exemple du signal détecté pour UbiK-SPA en deuxième dimension est montré.

7-b- Electrophorèse sur gel BN-PAGE

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de Bis-Tris (8 cm × 8 cm × 1 mm) commercialisé par Life technologies. Les protéines de faible poids moléculaire migrent plus loin. La taille apparente des protéines analysées est déterminée en se référant à un marqueur de poids moléculaire (Life Technologies). Comme décrit ci-dessus, les échantillons sont additionnés d'une solution de tampon natif avant d'être déposés dans les puits du gel.

La migration est réalisée à 4°C à 3 tensions différentes : 100 V (20 minutes environ) pour permettre aux protéines de pénétrer dans le gel ; puis 200 V (30 minutes environ) jusqu'à ce que le front de migration atteigne un-tiers du gel et enfin à 300 V (1h-1h30) jusqu'à ce que le front de migration atteigne la limite inférieure du gel. Le gel est ensuite soumis à un électrotransfert pour une analyse des protéines par Western-Blot (1D-BN-PAGE) ou un fragment de gel est coupé et analysé sur gel SDS-PAGE (2D-SDS-PAGE) ou par protéomique.

7-c- Transfert des protéines sur membrane PVDF

L'électrotransfert est réalisé sur une membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène ; Immobilon). Le transfert est effectué pendant trois heures à 20V et une intensité de 15 mA dans un tampon contenant du Tricine 50 mM et d'imidazole 7,5 mM (pH=7) dans une cuve Transblot (Life Technologies). Préalablement au transfert, la membrane PVDF est activée en l'incubant dans 100% méthanol pendant 3 minutes. A l'issue du transfert, la membrane devient bleue. Afin de visualiser les marqueurs de poids moléculaire, il faut la décolorer progressivement pour éliminer la coloration bleue du fond. Pour cela, la membrane est rincée plusieurs fois en présence d'un mélange de 25% méthanol et 10% d'acide acétique pendant une dizaine de secondes. Une fois que les marqueurs de poids moléculaire sont visibles, leur position sur la membrane est marquée au crayon de papier, puis une décoloration totale est effectuée avec 100% méthanol pendant trois minutes.

7-d- Electrophorèse en 2^{ème} dimension sur gel SDS-PAGE

Le gel de migration SDS-PAGE (12%) (6 mL d'une solution d'acrylamide / bisacrylamide 30% ; 0,375 M Tris-HCl pH=8,8 ; 5,25 mL d'eau ; 63 µL d'APS et 25 µL de TEMED) est préalablement préparé et coulé entre deux plaques en verre séparées de 1,5 mm. Ensuite, la piste est coupée du gel BN-PAGE, tamponnée pendant quelques minutes dans du tampon de migration (25 mM de Tris HCl pH=7,8 ; glycine 192 mM et SDS 1g/L ; pH=8,3) et est déposée horizontalement sur le sommet de ce gel. Sur du papier chromatographique Whatman (3mm d'épaisseur, 20*20cm, référence 3030-861, GE), 5 µL de marqueur de poids moléculaire (prestained protein ladder, Euromedex) ont été déposés puis le papier est positionné à côté du fragment du gel BN-PAGE. Les deux fragments de gel sont collés l'un à l'autre par un tampon contenant 0,5% d'agarose dissout dans du tampon de migration et quelques gouttes

de bleu de bromophénol (0,5% m/v). La migration est réalisée à 200 V dans un tampon contenant Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM et SDS 1% et est arrêtée au bout de 40 minutes lorsque le front de migration (visualisé par le bleu de bromophénol) atteint la limite inférieure du gel. Le gel est ensuite soumis à un électrotransfert pour une analyse des protéines par Western-Blot.

7-c- Immunodétection des protéines transférées sur membrane de PVDF

La membrane de PVDF est incubée pendant 45 minutes dans du tampon PBST+lait. La procédure de détection est identique à celle décrite dans 6-c.

8-Analyse des extraits lipidiques par HPLC-ECD

8-a- Extraction lipidique à partir des cellules

5 mL de cellules en phase exponentielle de croissance sont incubés sur glace pendant une dizaine de minutes avant centrifugation à 4000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 1 mL d'eau froide et transféré dans un tube eppendorff pré-pesé. Une nouvelle centrifugation à 13000 rpm pendant 2 minutes a été effectuée. Après élimination du surnageant, une troisième centrifugation à 13000 rpm a été effectuée pendant quelques secondes à température ambiante et le surnageant résiduel a été éliminé par pipettage pour obtenir un culot cellulaire dont la masse est déterminée (typiquement 5-10 mg). Le culot est ensuite stocké à -20°C jusqu'au jour de l'extraction.

50 µL de KCl 0.15 M, 100 µL de billes de verre (de diamètre 0,5 mm) et du coenzyme Q₁₀ (utilisé comme standard interne et dilué 400 fois dans de l'éthanol à partir d'une solution stock à 5 mM dans l'hexane ; ajout de 1µL de Q₁₀ pour 1 mg de cellules) sont ajoutés au culot cellulaire dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Ensuite, 600 µL de méthanol sont ajoutés puis les tubes sont agités pendant 10 min grâce à un vortex, après quoi, 400 µL d'éther de pétrole (point d'ébullition 40°C-60°C) sont ajoutés. Le mélange est vortexé pendant 3 min puis centrifugé à 5000 rpm pendant 1 min. La phase supérieure d'éther de pétrole est prélevée et transférée dans un nouveau tube eppendorf. 400 µL d'éther de pétrole sont de nouveau ajoutés à la phase de méthanol puis le mélange est vortexé pendant 3 min pour assurer une extraction complète. La phase d'éther de pétrole est prélevée après centrifugation à 13000 rpm pendant 1 min puis

combinée avec la précédente. Cet extrait lipidique qui contient le coenzyme Q₈ et les intermédiaires de biosynthèse est évaporé sous un flux d'argon. Les extraits secs sont ensuite stockés à -20°C.

8-b- Analyse par HPLC des extraits lipidiques

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse permet la séparation des constituants d'un mélange selon leur hydrophobicité. La phase stationnaire est composée de silice greffée par des groupements hydrophobes, le plus souvent des chaînes linéaires de 18 atomes de carbone (C-18). La phase mobile est un solvant polaire. Ainsi, les composés sont élués dans l'ordre de leur hydrophobicité croissante.

Les extraits lipidiques secs sont repris dans 100 µL d'un mélange de 98% éthanol et 2% perchlorate de lithium 1M ; un aliquot correspondant aux extraits de 1 mg de cellules (sauf indication contraire) est analysé par HPLC (Dionex U3000). Un schéma du système HPLC-ECD-MS est représenté en figure 26.

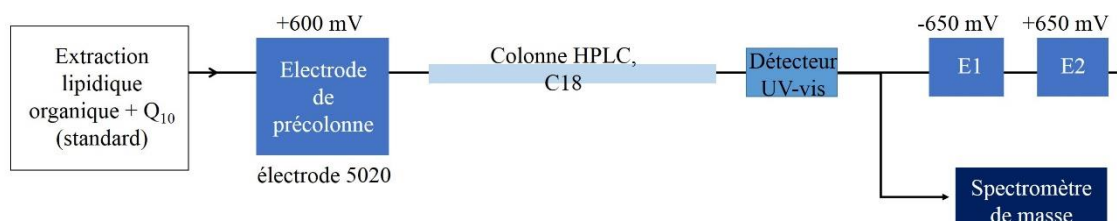


Figure 26: Schéma représentatif du système HPLC-ECD-MS utilisé.

Les hydroquinones présentes dans les extraits lipidiques sont oxydées avec une électrode 5020 située avant la colonne et réglée à un potentiel oxydant (+600 mV). La colonne HPLC utilisée est de type C18 (Betabasic-18, 5 µm, 4.6 x 150 mm, Thermo Scientific). L'éluion des molécules est réalisée soit à 1 mL/min avec 40% éthanol, 40% acétonitrile et 20% d'un mélange de 90 % d'isopropanol et 10 % de perchlorate de lithium 1 M pendant 16 minutes (méthode A), soit à 0,8 mL/min avec 10% isopropanol, 50% éthanol et 40% d'un mélange de 95 % de méthanol et 5 % de perchlorate de lithium 1 M pendant 22 minutes (méthode B). En sortie de colonne, un détecteur UV-visible à barrette de diode permet d'enregistrer les chromatogrammes à différentes longueurs d'ondes et d'enregistrer les spectres d'absorption UV-visible des

composés d'intérêt. La détection et la quantification des quinones se fait avec un détecteur électrochimique (ESA Coulochem III) et une cellule électrochimique analytique 5011A constituée de deux électrodes en série (E1, -650mV pour la réduction des quinones ; E2, +650 mV pour la réoxydation des quinones). Les électrochromatogrammes présentés dans la suite du manuscrit correspondent au signal obtenu à l'électrode E2. Une gamme étalon du standard interne Q₁₀ est effectuée dans les mêmes conditions d'analyse. Cette gamme a pour but, d'une part de normaliser la quantité de Q₈ et des autres intermédiaires des différents échantillons en tenant compte du matériel éventuellement perdu lors de l'extraction et d'autre part de convertir l'aire du pic électrochimique de Q₈ en pmoles.

8-c- Analyse des extraits lipidiques par spectrométrie de masse

Lorsque la détection par spectrométrie de masse (MS) est nécessaire, le perchlorate de lithium (non volatile) de la solution d'isopropanol est remplacé par l'acétate d'ammonium (10% d'une solution 1M) et 0.03% (v/v) d'acide formique est ajouté. Le flux est divisé après le détecteur UV-visible à barrette de diodes avec une vanne (split) de division réglable (Analytical Scientific Instruments) afin de permettre simultanément la détection électrochimique (60 % du débit) et l'analyse par spectrométrie de masse (40 % du débit) (figure 26). La détection par MS a été réalisée avec un spectromètre MSQ Plus (ThermoScientific) utilisé en mode positif avec ionisation par électrospray. La température de la sonde a été fixée à 450 °C et la tension de cône à 80V. En raison de la cellule de pré-colonne, les composés d'intérêts sont sous leur forme oxydée et sont détectés en MS sous la forme de leur adduit ammonium. Pour chaque analyse MS, plusieurs SIM (Selected Ion Monitoring) peuvent être enregistrées afin de détecter un ion spécifique ainsi qu'un scan complet de m/z 300 à 900.

9-Méthodes préparatoires pour la purification et l'analyse de DQ₈

9-a-Extraction lipidique à partir de la culture des cellules

La souche $\Delta ubiE$ cultivée en anaérobie accumule du DDMQ₈ (le substrat de UbiE, composé 6, figure 12), du DMK₈ et un composé électroactif de nature inconnue (composé X, figure 60, voir chapitre IV). Nous avons purifié ce composé afin de l'identifier. Pour cela, 6L de culture anaérobie en milieu LB des cellules $\Delta ubiE$ en début de phase stationnaire de croissance sont

centrifugées (à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C). Une extraction lipidique est réalisée à 50°C avec 150 ml d'acétone pendant 6 heures dans un extracteur de Soxhlet qui permet l'extraction continue des lipides contenus dans le culot cellulaire. Après plusieurs cycles d'évaporation, l'acétone s'enrichit progressivement en composés solubles. Le contenu en lipides est concentré par évaporation de l'acétone grâce à un évaporateur rotatif. Le ballon contenant les extraits lipidiques secs est conservé à 4°C à l'obscurité

9-b- Purification sur colonne de Silice:

L'extrait lipidique contenu dans le ballon est repris dans 3 mL de chloroforme puis déposé sur une colonne de silice (M60, Macherey Nagel ©). La colonne est préalablement équilibrée par 100 mL de chloroforme (2 volumes de colonne). L'élution des composés fixés sur la colonne se fait par 100% de chloroforme. La collecte des fractions se fait dans des tubes en verre (chaque fraction contient 25 mL). L'élution de DMK₈ se fait dans les 4 premières fractions, alors que le composé X est élué dans la fraction 5 et le DDMQ₈ est élué dans la fraction 6. Les composés d'intérêts sont concentrés par évaporation du solvant puis purifiés par HPLC (colonne C18) avec 100 % d'éthanol comme phase mobile. L'identification et la collecte du composé d'intérêt se base sur son spectre d'absorbance caractéristique présentant un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 264 nm. Le produit collecté est évaporé par rotation sous vide (rotavap) puis le produit sec est repris dans 100 µL d'éthanol et stocké à -80°C jusqu'au jour de l'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS).

9-c- Analyse du composé purifié par spectrométrie de masse

Les échantillons solubilisés dans l'éthanol additionnés de 0.1 % d'acide formique sont injectés dans une source nanospray ORBITRAP (Thermo Fischer Scientific) à un débit de 5 µL/min par l'intermédiaire d'un autosampler d'un système LC Ultimate 3000 (Dionex) avec une solution de 80 % d'isopropanol et 20 % du mélange (2 % d'acétonitrile et 0.1 % d'acide formique). La méthode MS utilise une plage de balayage de 150-1600 *m/z* et elle est composée d'événements MS et MS / MS utilisant l'ORBITRAP comme analyseur (à une résolution de 30000) pour obtenir une grande précision à la fois sur les ions parents et les fragments. Plusieurs énergies de fragmentation sont testées et la valeur optimale qui permet l'obtention d'une grande quantité de l'ion tropylium est 40 eV (énergie de collision normalisée).

QualBrowser de XCalibur est utilisé pour lire les spectres. Ces mesures ont été réalisées en collaboration avec Sylvie Kieffer-Jaquinod du laboratoire EDyP, CEA Grenoble.

10- Analyse protéomique de fragment de gel BN-PAGE excisé

Cette analyse protéomique a été réalisée en collaboration avec Sabine Brugière et Yohann Couté (EDyP-BGE-CEA).

10-a- Extraction peptidique de fragments de gel BN-PAGE

Les bandes de gel BN-PAGE ont été excisées manuellement et coupées en morceaux avant d'être traité automatiquement par le robot « Freedom EVO » de Tecan.

Les bandes ont été lavées par six incubations successives dans 25 mM de NH_4HCO_3 (bicarbonate d'ammonium) pendant 15 min, suivies de six incubations à 25 mM NH_4HCO_3 contenant 50% (v/v) d'acétonitrile. Les morceaux de gel ont été ensuite déshydratés avec 100% d'acétonitrile et incubés avec 10 mM de DTT dans 25 mM de NH_4HCO_3 pendant 45 min à 53°C et avec 55 mM d'iodoacétamide dans 25 mM NH_4HCO_3 pendant 35 min à l'obscurité. L'alkylation a été stoppée par l'addition de 10 mM de DTT dans 25 mM de NH_4HCO_3 (incubation pendant 10 min). Les morceaux de gel ont été ensuite lavés à nouveau par incubation dans 25 mM de NH_4HCO_3 suivie d'une déshydratation avec 100% d'acétonitrile. De la trypsine modifiée (Promega) dissoute dans 25 mM NH_4HCO_3 a été ajoutée aux morceaux de gel déshydratés pour une incubation à 37°C pendant une nuit. Les peptides ont été extraits à partir de morceaux de gel par trois étapes d'extraction séquentielle (15 min chacune) : dans 30 μL de 50% d'acétonitrile, 30 μL d'acide formique à 5% et enfin 30 μL de 100% d'acétonitrile. Les surnageants combinés ont été séchés sous vide.

10-b- Analyse par LC-MS/MS

Les peptides extraits secs ont été remis en suspension dans 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide trifluoroacétique et analysés par nanoLC-MS / MS (Ultimate 3000, Dionex et LTQ-Orbitrap Velos pro, Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été déposés sur une précolonne C18 (300 μm x 5 mm PepMap) et séparés sur une colonne C18 (75 μm x 250 mm, Dionex).

L'analyse nanoLC consiste en un gradient de 90 minutes à un débit de 300 nL / min du mélange de 96% du solvant A (2% d'Acétonitrile, 0,01% d'acide formique) et de 4% de solvant B (80% d'acide formique 0,08% d'acétonitrile). Le gradient du solvant B passe de 4% à 50% en 60 min, avant d'atteindre 90% en 1 min pendant 15 minutes et de revenir à 4% à partir de la 77^{ème} min jusqu'à la fin de l'analyse. Les spectres MS et MS/MS ont été acquis à l'aide d'Xcalibur (Thermo Scientific). La tension de pulvérisation a été fixée à 1,4 kV et la température de chauffage du capillaire a été ajustée à 200°C. La méthode MS utilise une plage de balayage de 400-1600 m/z et elle est composée d'événements MS et MS / MS utilisant l'ORBITRAP comme analyseur (à une résolution de 60000). L'enregistrement commence après l'accumulation de 10^6 ions (temps de remplissage maximum de 500 ms). Les vingt ions les plus intenses de l'analyse précédente enregistrés par l'Orbitrap ont été fragmentés avec une énergie de collision de 35 eV dans le LTQ et l'enregistrement de spectres commence après accumulation de 10^4 ions (temps de remplissage maximum de 100 ms).

11- Extraction plasmidique

Le kit « extraction d'ADN plasmidique, EZ-10 Spin Column » de la compagnie « BIO BASIC INC » est utilisé pour l'extraction d'ADN plasmidique. Les plasmides purifiés sont utilisés pour la transformation des bactéries. L'extraction est faite suivant les recommandations du manufacturier.

12- Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés dans des cuves en plastique de 1 cm de trajet optique pour déterminer la DO à 600 nm pour suivre la croissance des bactéries ou dans des cuves en quartz entre 250 et 600 nm pour mesurer la concentration de la solution de Q₁₀ utilisée comme standard interne ($\epsilon_{275nm} = 14600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Un spectrophotomètre nanodrop est utilisé pour déterminer la concentration d'ADN des solutions de plasmide à partir d'1 μL de solution (mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm).

13- Transformation des bactéries

13-a- Préparation de cellules compétentes

La base de la préparation des bactéries compétentes est l'utilisation de CaCl_2 qui dégrade leurs lipopolysaccharides de surface, les rendant ainsi aptes à la transformation par un vecteur. La souche à transformer est mise en croissance sur une boîte LB à 37°C toute une nuit. Une dizaine de colonies sont inoculées dans 100 mL de milieu LB à 37°C jusqu'à l'obtention d'une $\text{DO}_{600} = 0,6$. La culture est alors refroidie pendant 10 min dans la glace, puis centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C. Il est important de garder les cellules à 0-4°C durant le reste des manipulations. Après avoir jeté le surnageant, les cellules sont reprises avec 10 mL de CaCl_2 100 mM pendant 20-30 min. Puis une centrifugation est faite à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu (sans vortexer) dans 1 mL d'une solution de CaCl_2 100 mM + 15% glycérol stérile et froide puis est maintenu dans la glace pendant 15 min. Les cellules rendues compétentes sont aliquotées par 100 μL dans des tubes Eppendorf froids et sont congelées dans l'azote liquide. Elles sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

13-b- Transformation des bactéries par choc thermique

Lors de la transformation, 1 μg d'ADN est mis en présence de 100 μL de cellules compétentes sur glace pendant 30 min. Un choc thermique pendant 75 secondes à 42°C est ensuite effectué (dans un bain-marie). Ceci permet d'accentuer la déstabilisation de la bicouche lipidique et de stimuler la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Les cellules sont ensuite placées sur glace pendant environ 1 min avant d'ajouter 900 μL de milieu LB. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 45 min avant d'être étalées sur un milieu LB solide contenant l'antibiotique adapté à la sélection du plasmide. Les boîtes sont incubées la nuit à 37°C.

14- Dosage de protéines par BCA

Le dosage de protéines se fait par une méthode dite au BCA. En milieu alcalin, les protéines réduisent Cu^{2+} en Cu^+ . Le sel de l'acide bicinchoninic (BCA) forme un complexe coloré mesurable à 562 nm avec les ions Cu^+ . Quelques microlitres de l'échantillon à doser sont aliquotés (volumes différents pour la reproductibilité des résultats) dans une plaque à 96 puits et le volume est complété à 100 μL par ajout du tampon de lyse (tampon 1). Ensuite, 150 μL

du réactif BCA est ajouté et la plaque est incubée pendant une heure à 37°C. Une gamme étalon (0-100µg de protéines) avec la protéine BSA (Bovine Serum Albumin) est réalisée dans les mêmes conditions pour permettre de déterminer la concentration protéique de nos échantillons. La lecture d'absorbance à 562 nm se fait grâce à un lecteur de plaques TECAN.

Chapitre I : VisC (UbiI) est la monooxygénase qui catalyse l'hydroxylation en C5

Ce premier chapitre constitue mes travaux du stage de master 2 et des 6 premiers mois de thèse. Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans JBC en 2013 (**Hajj Chehade *et al.* 2013**). Les figures supplémentaires sont disponibles en annexe 1 de ce manuscrit.

1- Introduction :

La voie de biosynthèse de Q₈ comporte trois réactions d'hydroxylation dont deux ont été bien caractérisées et sont catalysées par les protéines UbiH et UbiF (**Kwon, Kotsakis, *et al.* 2000; Nakahigashi *et al.* 1992**) (réactions g et i, figure 12). La protéine qui catalyse la réaction d'hydroxylation en C5 est inconnue. Poon *et al.* ont proposé que la protéine UbiB soit la protéine responsable de cette réaction d'hydroxylation du fait qu'une souche *ΔubiB* accumule l'OPP (**Poon *et al.* 2000**). Cependant, l'accumulation de l'OPP ne constitue pas une preuve caractéristique d'une déficience en hydroxylation en C5 puisqu'une souche *ΔubiG* accumule également l'OPP. De plus, la séquence peptidique d'UbiB ne comporte pas d'homologie de séquence avec des monooxygénases mais plutôt montre des motifs caractéristiques des kinases. En cherchant le gène responsable de la catalyse de cette réaction d'hydroxylation en C5, nous avons trouvé le gène *visC* comme étant un gène candidat potentiel pour les raisons suivantes :

- VisC montre des homologies de séquence avec des monooxygénases à flavine : 30% et 37% d'identité de séquence avec UbiH et UbiF respectivement.
- Le gène *visC* est localisé en opéron avec le gène *ubiH* (figure 13).

Les principaux résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

- La délétion de *visC* entraîne une déficience forte en contenu de Q₈ et la souche *ΔvisC* accumule le 4HP₈ caractéristique d'une déficience en C5 spécifique de l'aérobie

- La surexpression de *visC* dans une souche mutante $\Delta coq6$ (Coq6 est la monooxygénase en C5 chez *S. cerevisiae*) entraîne une restauration de la biosynthèse de Q₆ et la croissance de cette souche mutante sur un milieu respiratoire.
- La structure cristallographique d'une forme tronquée de VisC montre une grande similarité avec celle du PHBH (para-hydroxybenzoate hydroxylase) qui est une monooxygénase à flavine.

Sur la base de ces résultats, nous avons proposé que VisC soit la protéine responsable de l'hydroxylation en C5 et nous avons changé son nom en UbiI (**Hajj Chehade *et al.* 2013**) qui est le nom utilisé dans la suite de ce manuscrit.

UbiI, a New Gene in *Escherichia coli* Coenzyme Q Biosynthesis, Is Involved in Aerobic C5-hydroxylation^{*[5]}

Received for publication, April 25, 2013. Published, JBC Papers in Press, May 24, 2013. DOI 10.1074/jbc.M113.480368

Mahmoud Hajj Chéade^{‡§¶1}, Laurent Loiseau^{¶1}, Murielle Lombard^{**}, Ludovic Pecqueur^{**}, Alexandre Ismail^{**}, Myriam Smadja^{**}, Béatrice Golinelli-Pimpaneau^{**}, Caroline Mellot-Draznieks^{**}, Olivier Hamelin^{‡§¶}, Laurent Aussel[¶], Sylvie Kieffer-Jaquinod^{‡‡}, Natty Labessan^{**}, Frédéric Barras[¶], Marc Fontecave^{**}, and Fabien Pierrel^{‡§¶2}

From the [‡]Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux, F-38054 Grenoble, France, the [§]CNRS, UMR5249, F-38054 Grenoble, France, the [¶]Université Joseph Fourier-Grenoble I, UMR5249, F-38041 Grenoble, France, the ^{||}Laboratoire de Chimie Bactérienne, Aix-Marseille Université, UMR7283, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France, the ^{**}Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France-CNRS FRE3488, 11 Place Marcellin-Berthelot, 75005 Paris, France, and the ^{‡‡}Etude de la Dynamique des Protéomes, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, U1038 INSERM/CEA/Université Joseph Fourier, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Background: The C5-hydroxylation reaction of coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* is catalyzed by an unknown enzyme.

Results: The UbiI protein is responsible for the C5-hydroxylation reaction.

Conclusion: The three monooxygenases involved in aerobic Q biosynthesis are now identified.

Significance: We report the characterization of a gene of unknown function and the first crystal structure of a monooxygenase involved in Q biosynthesis.

Coenzyme Q (ubiquinone or Q) is a redox-active lipid found in organisms ranging from bacteria to mammals in which it plays a crucial role in energy-generating processes. Q biosynthesis is a complex pathway that involves multiple proteins. In this work, we show that the uncharacterized conserved *visC* gene is involved in Q biosynthesis in *Escherichia coli*, and we have renamed it *ubiI*. Based on genetic and biochemical experiments, we establish that the UbiI protein functions in the C5-hydroxylation reaction. A strain deficient in *ubiI* has a low level of Q and accumulates a compound derived from the Q biosynthetic pathway, which we purified and characterized. We also demonstrate that UbiI is only implicated in aerobic Q biosynthesis and that an alternative enzyme catalyzes the C5-hydroxylation reaction in the absence of oxygen. We have solved the crystal structure of a truncated form of UbiI. This structure shares many features with the canonical FAD-dependent para-hydroxybenzoate hydroxylase and represents the first structural characterization of a monooxygenase involved in Q biosynthesis. Site-directed mutagenesis confirms that residues of the flavin binding pocket of UbiI are important for activity. With our identification of UbiI, the three monooxygenases necessary for aerobic Q biosynthesis in *E. coli* are known.

Coenzyme Q (ubiquinone or Q)³ is a widespread redox-active lipid essential for electron and proton transport in the respiratory chains from bacteria to mammals (1, 2). Q is composed of a fully substituted benzoquinone ring to which is attached a polyisoprenyl tail with a number of isoprenyl units varying from one species to another (6 in *Saccharomyces cerevisiae*, 10 in humans, and 8 in *Escherichia coli*). Biosynthesis of Q is a highly conserved pathway that involves a large number of genes that have been identified mostly from seminal genetic studies using *S. cerevisiae* and *E. coli* (3, 4). However, our genetic understanding of Q biosynthesis is still incomplete, and very few Q biosynthetic proteins have been isolated and characterized biochemically.

Biosynthesis of Q₈ in *E. coli* requires 9 Ubi proteins (UbiA–H and UbiX); most of them are involved in reactions that modify the aromatic ring of the 4-hydroxybenzoic acid (4-HB) universal precursor (Fig. 1). After prenylation of 4-HB catalyzed by UbiA, UbiX and UbiD are proposed to be involved in the decarboxylation (5). Three methylation (*reactions d, f, and h*, Fig. 1) and three hydroxylation reactions (on C5, C1, and C6, *reactions c, e, and g*, respectively) follow to yield Q₈. UbiG catalyzes both O5- and O6-methylation (6) whereas UbiE is the C2-methyltransferase (7). The genes encoding the enzymes responsible for the aerobic C1- and C6-hydroxylation reactions have been identified as *ubiH* and *ubiF*, respectively (8, 9) (Fig. 1). UbiF and

^{*} This work was supported by Agence Nationale de la Recherche Grant JCJC SVSE 8-2011, Project pABACoQ (to F. P.) and Sup'Biotech (to A. I.).

^[5] This article contains supplemental Figs. S1–S5, Tables S1–S4, Materials and Methods, and additional references.

The atomic coordinates and structure factors (code 4K22) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV, Bat K', P272, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel.: 33-4-38-78-91-10; Fax: 33-4-38-78-91-24; E-mail: fabien.pierrel@cea.fr.

³ The abbreviations used are: Q, coenzyme Q; Bistris propane, 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane; DDMQ₈, C1-demethyl-C6-demethoxy-Q₈; ECD, electrochemical detection; 4-HB, 4-hydroxybenzoic acid; 4-HP₆, 3-hexaprenyl-4-hydroxyphenol; 4-HP₈, 3-octaprenyl-4-hydroxyphenol; MK₈, menaquinone; OPP, 3-octaprenylphenol; pABA, para-aminobenzoic acid; PHBH, para-hydroxybenzoate hydroxylase; Q₄, coenzyme Q₄; Q₈, coenzyme Q₈; Q₁₀, coenzyme Q₁₀; SEC-MALLS, size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering; UbiI_{tr}, truncated UbiI.

Ubil Functions in *Escherichia coli* Coenzyme Q Biosynthesis

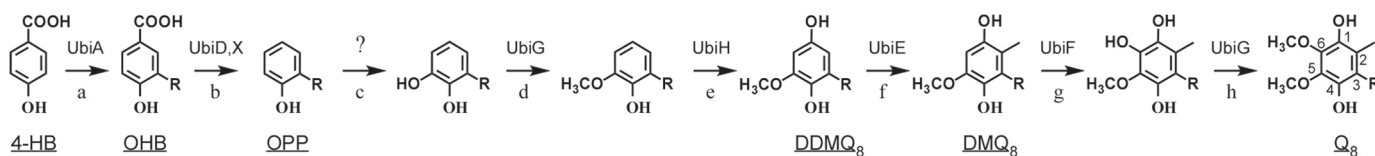


FIGURE 1. **Biosynthetic pathway of coenzyme Q₈ in *E. coli*.** The numbering of the aromatic carbon atoms used throughout this study is shown on Q₈, and the octaprenyl tail is represented by *R* on carbon 3 of the different biosynthetic intermediates. The name of the enzymes catalyzing the reactions (each labeled with a lowercase letter) is indicated. The enzyme catalyzing the C5-hydroxylation (reaction *c*) is unknown (see full text for further details). Abbreviations for coenzyme Q₈ (Q₈), C6-demethoxy-Q₈ (DMQ₈), C1-demethyl-C6-demethoxy-Q₈ (DDMQ₈), 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoic acid (OHB), and 3-octaprenylphenol (OPP) are underlined.

UbiH share 32% of sequence identity and are defined as members of class A flavoprotein monooxygenases from sequence analysis (10), even though they have not been isolated in pure form and characterized *in vitro*. In contrast, the gene responsible for the C5-hydroxylation reaction in *E. coli* (reaction *c* on Fig. 1) remains unknown. UbiB has been proposed to be involved in this reaction based on the accumulation of OPP (Fig. 1) in a *ubiB*[−] strain (11, 12). However, accumulation of OPP does not necessarily reflect a defect in C5-hydroxylation because a strain deficient in the methyltransferase UbiG also accumulates OPP (13). Moreover, the primary sequence of UbiB does not contain any motif characteristic for hydroxylases but instead displays conserved motifs found in a superfamily of ancestral kinases (14).

Searching the gene responsible for the C5-hydroxylation, we reasoned that *visC*, a gene of unknown function, could be a good candidate to investigate because it locates immediately downstream of *ubiH* within the same operon (9). Furthermore, *visC* is predicted to encode a protein with the typical domains shared by flavoprotein monooxygenases and with 30 and 39% sequence identity to UbiH and UbiF, respectively (supplemental Fig. S1) (10). In the present study, we report genetic and biochemical experiments that unambiguously establish that VisC participates in coenzyme Q₈ biosynthesis by catalyzing the aerobic C5-hydroxylation reaction. We therefore propose to change the name of VisC into UbiI. We succeeded in purifying the protein and crystallizing a truncated form of UbiI. The crystal structure shows a high degree of similarity with that of para-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH) a well characterized FAD-dependent monooxygenase (15). Albeit incomplete, our structure of UbiI is the first crystal structure of a monooxygenase associated with ubiquinone biosynthesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Growth Conditions—*E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB)-rich medium at 37 °C. Anaerobic cultures were performed in sealed 15-ml Falcon tubes filled to the top with culture medium. Strains used in this study are listed in supplemental Table S1. Ampicillin (50 μg/ml) and kanamycin (25 μg/ml) were added when necessary. All of the strains are *E. coli* K-12 derivatives. Strains JW2874, JW2875, JW0659, and JW5581 from the Keio collection (16) were kindly provided by P. Moreau (LCB, Marseille) and were the donor of the *ΔubiI::kan*, *ΔubiH::kan*, *ΔubiF::kan*, and *ΔubiE::kan* mutations. The *ΔubiI* strain was cured to yield *ΔubiI* which was then used to construct the *ΔubiFΔubiI* and *ΔubiEΔubiI* strains. Each mutation was transduced via P1 phage into MG1655. Mutations

were confirmed using colony PCR with primers flanking the mutation.

S. cerevisiae was transformed using lithium acetate and was grown in YNB without pABA and folate (MP Biomedicals) with the indicated carbon sources (17).

Plasmid Construction—Plasmids are listed in supplemental Table S1, and their construction is detailed in the supplemental Materials and Methods.

Quinone Extraction and Quantification by HPLC-Electrochemical Detection (ECD) Analysis—5 ml of cells in exponential phase were centrifuged, and the pellet mass was determined. Glass beads (100 μl), 50 μl of 0.15 M KCl, and a volume of a Q solution (used as an internal standard) proportional to the wet weight were added to cell pellet. Q₁₀ was used for *E. coli* samples and Q₄ for *S. cerevisiae* samples. Lipids extraction was performed by adding 0.6 ml of methanol, vortexing for 10 min, then adding 0.4 ml of petroleum ether (boiling range 40–60 °C) and vortexing for 3 min. The phases were separated by centrifugation 1 min, 5000 rpm. The upper petroleum ether layer was transferred to a fresh tube. Petroleum ether (0.4 ml) was added to the glass beads and methanol-containing tube, and the extraction was repeated. The petroleum ether layers were combined and dried under nitrogen. The dried samples were stored at −20 °C and were resuspended in 100 μl of 98% ethanol, 20 mM lithium perchlorate. Aliquots were analyzed by reversed-phase HPLC with a C18 column (Betabasic-18, 5 mm, 4.6 × 150 mm; Thermo Scientific) at a flow rate of 1 ml/min using 40% ethanol, 40% acetonitrile, and 20% of a mix of 90% isopropyl alcohol and 10% lithium perchlorate (1 M) as a mobile phase. The mobile phase used to analyze yeast extracts was 5% isopropyl alcohol, 20% acetonitrile, and 75% of a mix of 98% methanol and 2% lithium perchlorate (1 M). Quinones were quantified with an ESA Coulochem III electrochemical detector and a 5011A analytical cell (E1, −650 mV; E2, 650 mV). Hydroquinones present in samples were oxidized with a precolumn 5020 guard cell set in oxidizing mode (E, +650 mV). Different volumes of the standard Q solutions were injected in the same conditions to correct for sample loss during the organic extraction on the basis of the recovery of the Q internal standard. Standard curves for Q₄ and Q₁₀ were used for Q₆ and Q₈ quantification, respectively.

4-HP₈ Purification and Characterization—12 liters of LB culture of *ΔubiI* cells in stationary phase were centrifuged (4000 rpm, 15 min), and cell pellet mass was determined (30 g). Lipid extraction was performed for at least ten cycles at 50 °C with 150 ml of acetone using a Soxhlet extractor. The extract was concentrated with a rotary evaporator, resuspended in chloro-

form and applied on a silica column (M60; Macherey Nagel). Elution of molecules was realized with 100% of chloroform. Compounds of interest were collected in glass tubes, and 4-HP₈ was further purified by HPLC with 40% acetonitrile, 40% ethanol, and 20% of a mix of 90% isopropyl alcohol and 10% of water. Oxidized and reduced forms of 4-HP₈ were purified based on their characteristic UV spectra (see supplemental Fig. S3D). NMR spectra were recorded on a Bruker EMX 300 MHz spectrometer with D₆-ethanol as solvent. Mass spectrometry measurements were carried out as described in the supplemental Materials and Methods.

Expression and Purification—Overexpression of UbiI was achieved by using BL21 (DE3) *E. coli* strain (Novagen) transformed with pET-*ubiI*-His₆. The cultures were grown at 37 °C until they reached A₆₀₀ = 0.4 and then shifted to 20 °C for induction. Isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside was added to 0.1 mM, and growth continued overnight. All subsequent operations were carried out at 4 °C. Cells were harvested by centrifugation. The cell pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 30% glycerol (v/v), and 1 mM Pefabloc (VWR). After sonication, the lysate was centrifuged at 180,000 × g for 90 min. The resulting supernatant was loaded onto nickel-nitrilotriacetic acid Superflow resin (Qia-gen) equilibrated with buffer 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM imidazole, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, and 30% glycerol (v/v). UbiI was eluted with 250 mM imidazole, and after imidazole removal by ultrafiltration with Amicon Ultra 30K columns (Millipore), the purified protein was found to be >95% pure as judged by SDS-PAGE. The purified protein was aliquoted and stored at −80 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, and 30% glycerol (v/v). Selenomethionylated UbiI was overexpressed according to the indicated protocol (18) and purified with the same protocol as the native UbiI.

Limited Trypsin Proteolysis—To optimize the conditions of limited proteolysis, experiments were first conducted on an analytical scale (500 μg of UbiI) where ratios of enzyme (trypsin) over substrate (UbiI) ranged from 1:15 to 1:1000 (w/w) in a final volume of 200 μl. Digestion time was then optimized for a fixed enzyme over substrate ratio. Tryptic digestion analysis was performed by SDS-PAGE. Large scale preparation of cleaved UbiI was then carried out in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 30% glycerol (v/v) at a protein concentration of 3 mg/ml. After 2 h of incubation of UbiI (21 mg) with trypsin (42 μg) at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of Pefabloc (1 mM), followed by analytical SDS-PAGE. The N-terminal 40-kDa domain, which lacks the C-terminal His₆ tag, was purified on a nickel-nitrilotriacetic acid Superflow resin by collecting the flow-through and concentrated to 6–8 mg/ml in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol.

Protein Analysis—Mass spectrometry analysis (MALDI-TOF) was performed to delineate the C-terminal boundary of the N-terminal 40-kDa domain of UbiI, with the MASCOT software and Findpept tool (SiCaPS platform of IMAGIF (Gif-sur-Yvette, France). SEC-MALLS experiments were performed to determine the oligomeric state of the protein, in 25 mM Tris-HCl, pH 7.3, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol (IMAGIF Structural and Proteomic Biology Unit, Gif-sur-Yvette, France).

Crystallization—Crystals were grown at 19 °C by the hanging drop vapor diffusion method. 1 μl of protein (6–8 mg/ml) was mixed with 1 μl of precipitant solution consisting of 0.1 M Tris, pH 8.5, 12% (w/v) polyethylene glycol 4000, 0.1 M NaCl, 0.2 M MgCl₂, which led to plate crystals within 2–3 days. For the selenomethionylated protein, the precipitant solution was 0.1 M Bistris propane, pH 9.0, 14% (w/v) polyethylene glycol 4000, 0.1 M NaCl, 0.15 M MgCl₂.

Data collection and structure determination were carried out as described in the supplemental Materials and Methods.

Docking Methods—A potential binding site of FAD in UbiI_{tr} was explored using docking calculations. Comparing the binding site residues of FAD in PHBH (1PBE) with those in the crystal structure of UbiI_{tr}, we noted that a number of residues are not favorably oriented to allow the docking of FAD. Preliminary to docking calculations, a UbiI_{tr} monomer was thus prepared as follows: (i) Rotamers of Arg-49, Arg-35, and Asp-164 were selected to allow the one-step insertion of a rigid model of FAD in its extended conformation as observed in 1PBE. (ii) The binding site residues were further energy minimized using CHARMm in Discovery Studio 3.1. The resulting protein structure was then used as the receptor, and FAD was docked as a flexible ligand using Autodock software (19). The docking results place FAD in a range of plausible positions spanning the length of the binding pocket of UbiI_{tr}. Among the best docked structures, we detail here a potential location of the FAD cofactor in UbiI selected for its highest similarity with the conformation observed in 1PBE. There is a rather good correspondence for ligand-receptor interactions between PHBH-FAD (1PBE) and the modeled UbiI_{tr}-FAD complex (supplemental Table S4).

RESULTS

***E. coli* Δ*ubiI* Synthesizes Low Q₈ Level in Aerobic Conditions**—We constructed a Δ*ubiI* strain in which the ORF of *ubiI* has been replaced with a kanamycin resistance cassette. Δ*ubiI* cells display a growth comparable with WT cells both on glucose and on succinate media (supplemental Fig. S2A) unlike Δ*ubiH* cells, as observed previously (9). Evaluation of the cellular content in electroactive isoprenoid quinones by using ECD of lipid extracts after separation by HPLC (17, 20) revealed that Q₈ content in Δ*ubiI* cells accounted for only 7% of that in WT cells (Fig. 2A). Furthermore, an unknown electroactive compound X could be detected (Fig. 2B). The levels of the isoprenoid naphthoquinones, demethylmenaquinone and menaquinone (MK₈), were not significantly different in WT and Δ*ubiI* cells (Fig. 2B and supplemental Fig. S2B). Transformation of Δ*ubiI* cells with a plasmid containing the *ubiI* ORF restored Q₈ content and abolished the accumulation of compound X (Fig. 2, A and B). Δ*ubiI* cells grown anaerobically had a content of Q₈ comparable with that in WT cells (Fig. 2, C and D), and accumulation of compound X was abolished. As expected, a strong increase in MK₈ content was observed in cells grown anaerobically (21). Reversion of the Q₈ biosynthetic defect by anaerobic growth of Δ*ubiI* cells is reminiscent of the phenotype of a Δ*ubiH* strain (22) (Fig. 2, C and D). Collectively, these data establish that UbiI is involved in aerobic Q₈ biosynthesis but not in MK₈ biosynthesis.

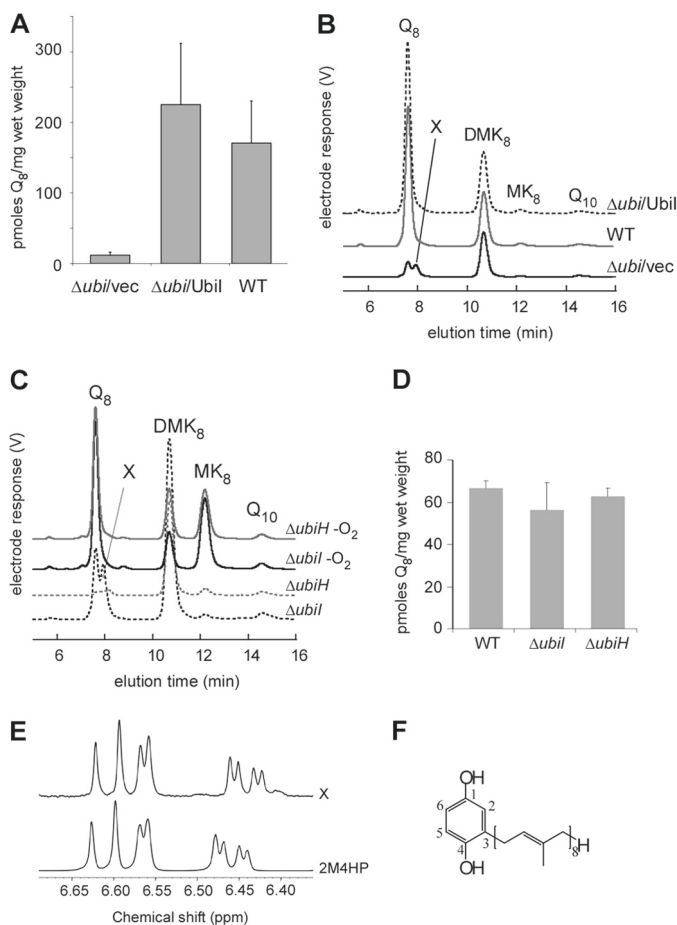


FIGURE 2. *Δubil* cells have a decreased Q₈ content in aerobic conditions and accumulate 4-HP₈. A, quantification of cellular Q₈ content ($n = 6-8$) in lipid extracts from WT and *Δubil* cells containing an empty vector pBAD (*vec*) or pBAD-*ubil*. Error bars are S.D. B, HPLC-ECD of lipid extracts from 2 mg of the same cells as in A. The peaks corresponding to Q₈, compound X, demethylmenaquinone (DMK₈), MK₈, and to the Q₁₀ standard are marked. C, HPLC-ECD of lipid extracts from 2 mg of *Δubil* cells (in black) or *ΔubiH* cells (in gray) grown in aerobic (dashed lines) or anaerobic conditions (solid lines). D, quantification of cellular Q₈ content of cells described in A ($n = 3$). Error bars are S.D. E, superimposition of the aromatic region of the ¹H NMR spectra of compound X and of commercial 2-methyl-4-hydroxyphenol (2M4HP) in D₆-ethanol. F, Chemical structure of 4-HP₈.

***E. coli Δubil* Accumulates 4-HP₈**—Compound X was purified from *Δubil* cells and found to be present in two redox states. Analysis by high resolution mass spectrometry in positive mode gave a m/z ratio ($M + H^+$) of 655.5445 for reduced compound X and 653.5297 for the oxidized form corresponding respectively to chemical formulas of C₄₆H₇₀O₂ + H⁺ ($M = C_{46}H_{70}O_2$; 654.53755; ppm, 1.3) and C₄₆H₆₈O₂ + H⁺ ($M = C_{46}H_{68}O_2$; 652.5219; ppm, 0). Fragmentation of the 653.5 molecular ion yielded a characteristic tropylium-like ion (C₇H₇O₂⁺), often found for aromatic compounds containing a benzyl unit, in addition to fragments corresponding to loss of methine, methylene, or methyl groups of an octaprenyl tail in the molecule (supplemental Fig. S3A). These data are consistent with compound X being a phenyl ring functionalized with an octaprenyl tail and either two OH groups in the reduced (quinol) C₄₆H₇₀O₂ molecule or two keto groups in the oxidized (quinone) C₄₆H₆₈O₂ molecule (supplemental Fig. S3B). The ¹H NMR spectrum of the purified C₄₆H₇₀O₂ compound shows

well defined peaks both in the aromatic and aliphatic regions (supplemental Fig. S3C). Most of the signals in the 3.2–5.3 ppm region could be attributed to the vinylic and allylic protons of the octaprenyl substituent. The aromatic region of the spectrum shows more relevant information. Three distinguishable massifs, each corresponding to a unique proton, can be observed at 6.44 ppm (doublet of doublet with ⁴*J* and ³*J* coupling constants), 6.57 ppm (doublet with a ⁴*J* coupling constant), and 6.61 ppm (doublet with a ³*J* coupling constant) (Fig. 2E). These results confirm a 1,2,4-trisubstitution of the phenyl ring. The NMR spectrum of the commercially available 2-methyl-4-hydroxyphenol shows a highly similar pattern with close chemical shifts and coupling constants (Fig. 2E). The NMR data thus establish that the two hydroxyl groups of the C₄₆H₇₀O₂ compound are in para relative position. Accordingly, the UV spectra of oxidized and reduced forms of compound X and of 2-methyl-4-hydroxyphenol are comparable (supplemental Fig. S3, D and E). Collectively, all of these data identify 4-HP₈ (Fig. 2F) as the compound that accumulates in *Δubil* cells.

UbiI* Complements a C5-hydroxylation Defect in *S. cerevisiae—Drastic decrease of Q₈ and accumulation of 4-HP₈, lacking a OH or a OCH₃ group at C5 are strong indications that the C5-hydroxylation reaction is deficient in *E. coli Δubil* cells and that UbiI functions as a C5-hydroxylase in Q₈ biosynthesis. To verify this hypothesis, we tested whether heterologous expression of UbiI was able to complement a *S. cerevisiae Δcoq6* strain which lacks the C5-hydroxylase Coq6 (17). In combination with Coq8 overexpression, required for maintaining the integrity of the Q biosynthetic complex in *S. cerevisiae* (23), the mitochondria-targeted *E. coli UbiI* protein was found to partially restore respiratory growth of *Δcoq6* cells on lactate-glycerol medium, a process that requires coenzyme Q (Fig. 3A). HPLC-ECD analysis of cellular lipid extracts of *Δcoq6*/Coq8+UbiI cells demonstrated the presence of Q₆ together with 4-HP₆ (Fig. 3B) whereas *Δcoq6*/Coq8 cells accumulated exclusively 4-HP₆ (17). Complementation by UbiI is not optimal but is nevertheless significant because *Δcoq6*/Coq8+UbiI cells contain approximately 12% of the amount of Q₆ present in *Δcoq6*/Coq6 cells (Fig. 3C). These results establish that UbiI can function as a C5-hydroxylase in *S. cerevisiae*.

The residual C5-hydroxylase Activity in Δubil Cells Is Provided by UbiF—*Δubil* cells synthesize a small amount of Q₈ (Fig. 2A), reflecting that the C5-hydroxylation activity, although limited, is still taking place. To test the involvement of genes of the Q pathway in this biosynthetic activity, we constructed *ΔubiF Δubil* and *ΔubiE Δubil* mutants. *ΔubiE* cells accumulate the biosynthetic intermediate C2-demethyl-C6-demethoxy-Q₈ (DDMQ₈, peak at 6.87 min in Fig. 4A), as published before (7). Deletion of *ubil* in a *ΔubiE* strain led to the accumulation of 4-HP₈ and of a diminished amount of DDMQ₈ (Fig. 4A). In contrast, deletion of *ubil* in the *ΔubiF* strain caused the expected accumulation of 4-HP₈ but also the complete disappearance of DMQ₈ (Fig. 4B), showing that the C5-hydroxylation reaction is totally abolished in the *ΔubiF Δubil* strain. Collectively, these results demonstrate that the residual C5-hydroxylase activity observed in *Δubil* cells is provided by UbiF, the C6-monooxygenase.

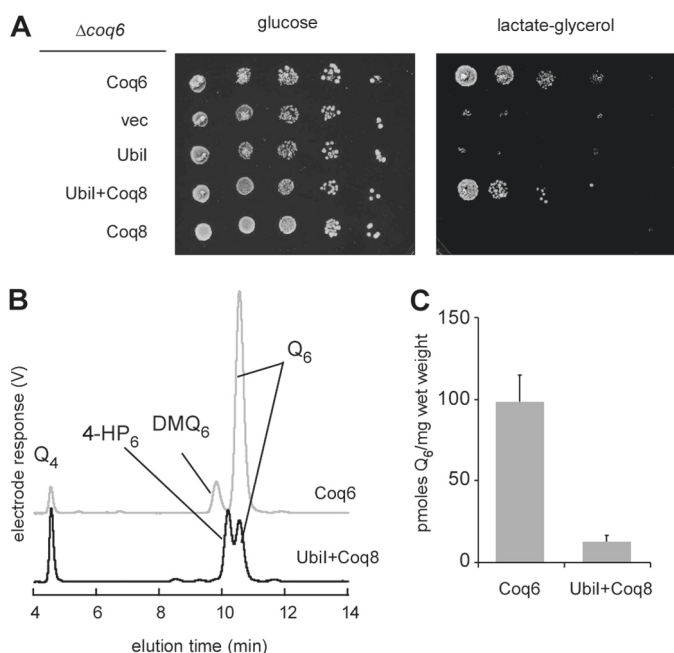


FIGURE 3. Ubil displays C5-hydroxylase activity in *S. cerevisiae*. A, *S. cerevisiae* $\Delta coq6$ cells transformed with pRS416-COQ6 plasmid encoding Coq6, an empty vector (vec), or with pRS426 TDH3-ubil, an episomal vector encoding Ubil in combination or not with pRS423-COQ8 grown in YNB-pABA-folate 2% galactose 0.4% glucose for 24 h. Serial dilutions were spotted onto agar plates. The plates contained synthetic medium-pABA-folate + 10 μ M 4-HB with either 2% glucose or 2% lactate-2% glycerol. The plates were incubated for 2 days (glucose) or 4 days (lactate-glycerol) at 30 °C. B, HPLC-ECD of lipid extracts from 2 mg of $\Delta coq6$ cells expressing Coq6 or from 6 mg of $\Delta coq6$ cells expressing Ubil in combination with Coq8. Cells were grown in YNB-pABA-folate 2% lactate-2% glycerol supplemented with 10 μ M 4-HB. Peaks corresponding to demethoxy- Q_6 (DMQ₆), Q_6 , 4-HP₆, and to the Q_4 standard are marked. C, Q_6 content of $\Delta coq6$ cells containing either pRS416-COQ6 or pRS426 TDH3-ubil in combination with pRS423-COQ8 grown in the same medium as in B. Error bars are S.D. ($n = 4$).

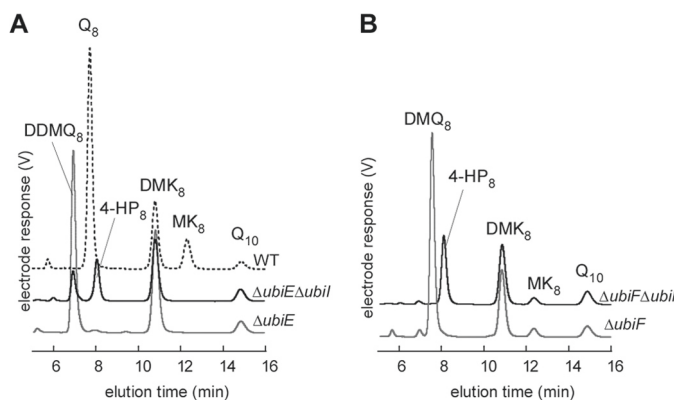


FIGURE 4. UbiF is responsible for the residual C5-hydroxylation in the absence of Ubil. A, HPLC-ECD of lipid extracts from 2 mg of WT cells (dashed black line), $\Delta ubiE$ cells (in gray), or $\Delta ubiE\Delta ubil$ cells (in black). B, HPLC-ECD of lipid extracts from 2 mg of $\Delta ubiF$ cells (in gray) or $\Delta ubiF\Delta ubil$ cells (in black).

Crystal Structure of a C-terminal Truncated Form of Ubil—We overexpressed and purified the Ubil-His₆ protein which contains a C-terminal His₆ tag. However, the protein was cofactor-free, as shown by UV-visible spectroscopy, and highly unstable, with a significant propensity to aggregate and precipitate. Limited trypsin proteolysis of Ubil-His₆ generated a soluble fragment (molecular mass ~40 kDa, supplemental Fig. S4A). MALDI-TOF mass spectrometry of the Ubil_{tr} (supplemental Fig. S4B) together

with the result that Ubil_{tr} does not bind to nickel-nitrilotriacetic acid, suggested that ~35 residues at the C terminus had been removed (two cleavage sites after residue 364 and 365, respectively), as confirmed below by the crystal structure of Ubil_{tr}. The truncated Ubil_{tr} protein expressed from a plasmid was not able to complement the $\Delta ubiL$ strain because the quinone profile was similar to that of $\Delta ubiL$ cells containing an empty vector (supplemental Fig. S4C). Ubil_{tr} behaved as a tetramer in solution, as shown by SEC-MALLS experiments (supplemental Fig. S4D), and crystallized in space group P2₁2₁2.

The structure of the native Ubil_{tr} protein was solved at 2.8 Å resolution by the single anomalous dispersion method using the selenomethionylated protein and refined to 2.0 Å resolution (supplemental Table S2 and supplemental Fig. S5). The overall tertiary structure of the tetramer reveals that each monomer contains a typical FAD-binding domain with a Rossman-like $\beta/\alpha/\beta$ -fold (Fig. 5A). A search for proteins with similar fold with DALI (24) indicates that the structure of Ubil_{tr} is similar to that of several flavin-dependent monooxygenases, including PHBH from *Pseudomonas fluorescens* (supplemental Table S3). Superimposition of the structure of Ubil_{tr} with that of PHBH in complex with FAD (Fig. 5B) supports the presence of a FAD binding pocket in Ubil_{tr}.

The FAD Binding Site in Ubil_{tr}—The existence of a binding site for a FAD cofactor in Ubil was confirmed with docking experiments and minimization simulations using a Ubil_{tr} monomer and the extended conformation of FAD from PHBH (1PBE) as the starting position (25). The results of these calculations are shown in Fig. 5C. The docked FAD in Ubil_{tr} exhibits a number of canonical interactions reminiscent of those involving FAD in PHBH, especially at the isoalloxazine ring and the ribityl chain (Fig. 5C and supplemental Table S4).

Fig. 5C shows that the isoalloxazine ring is located within hydrogen bonding distances of the main-chain nitrogens of Leu-297, Val-302, Asn-303, and Ala-52, and the side-chain amide nitrogen atom of Asn-303. Also, it may be stabilized by π -stacking with Phe-269, an interaction shared in a number of other flavoproteins (26–28). The ribityl chain is hydrogen-bonded to side chains of Arg-49 and Asn-110, as it is in PHBH using Arg-44 and Gln-102. Finally, the negatively charged pyrophosphate group is electrostatically complemented by: (i) the α 1 helix dipole of the $\beta/\alpha/\beta$ -fold at the N terminus as in PHBH; (ii) hydrogen bonding with the side chain of Arg-49 residue (Arg-44 in PHBH) and the main chain of Met-13, a residue within the conserved GXGXXG motif of flavoproteins (Ser-13 in PHBH).

Our model of the docked FAD in Ubil_{tr} was validated by site-directed mutagenesis. We indeed mutated both residues Gly-301 and Asn-303, which are conserved in flavoprotein monooxygenases (29) (supplemental Fig. S1). These residues form the bottom of the isoalloxazine binding pocket in Ubil_{tr}. Expression of Ubil-G301A-N303D in the $\Delta ubiL$ strain led to a $Q_8/4$ -HP₈ ratio comparable with that found in $\Delta ubiL$ cells containing an empty vector (Fig. 5D). In contrast, expression of Ubil led to the complete disappearance of 4-HP₈ (Fig. 2B). These results show that the G301A/N303D double mutation strongly impairs Ubil activity probably as the consequence of a

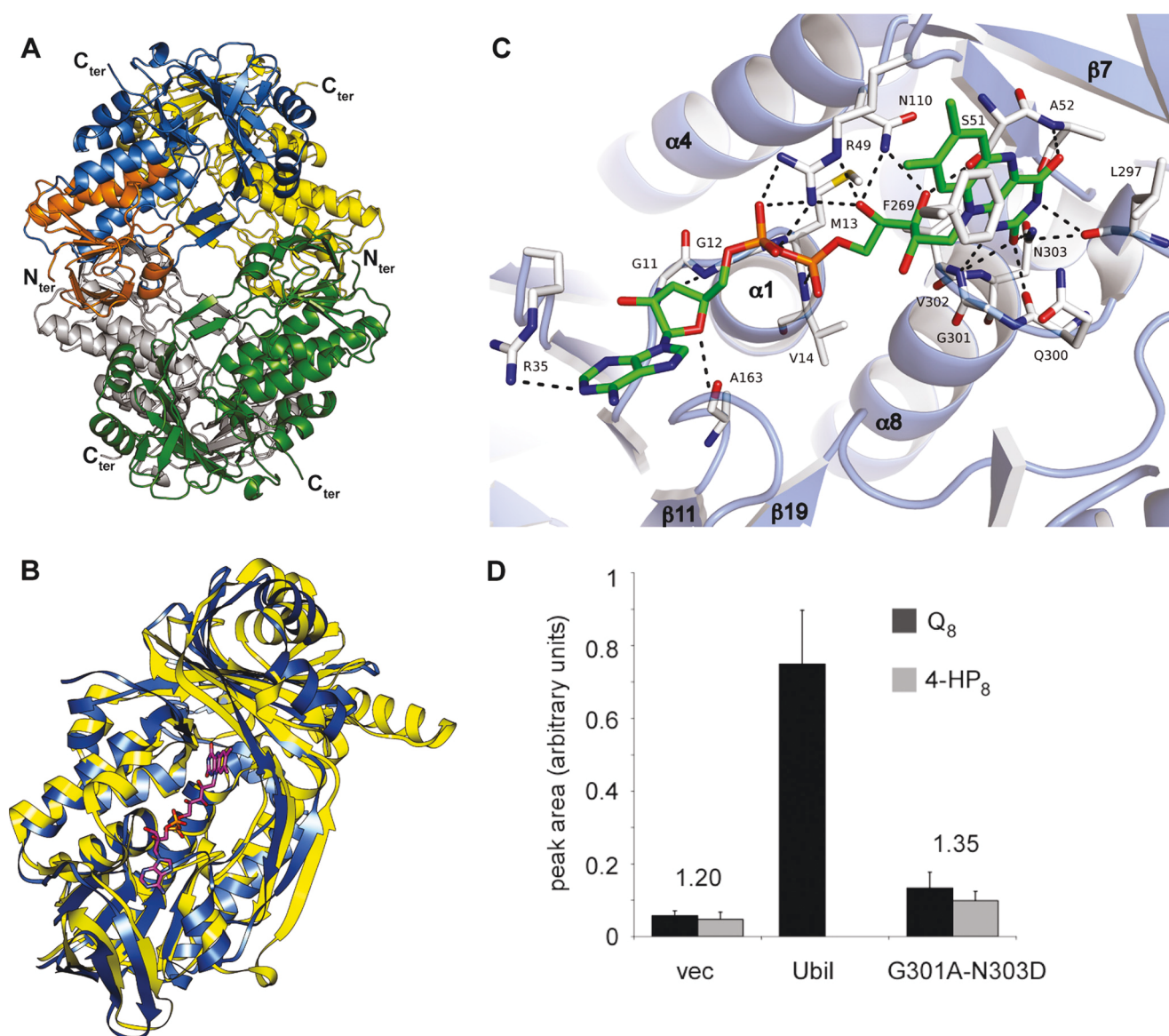


FIGURE 5. Crystal structure of a truncated form of UbiL and its FAD binding site. *A*, ribbon diagram of the crystal structure of tetrameric UbiL_{tr}. Each subunit is represented with a different color with the Rossman-like $\beta/\alpha/\beta$ -fold of one subunit highlighted in orange. *B*, DALI superimposition of UbiL_{tr} (blue) with PHBH (yellow; Protein Data Bank ID code 1PBE) and the FAD of PHBH shown as ball and sticks. The root mean square deviation is 3.0 Å for 327 C α . *C*, Docking of FAD in UbiL_{tr}. Residues involved in hydrogen bonding and π -type interactions are represented. See details in supplemental Table S4. *D*, corrected integration of the electrochemical signal for the peaks corresponding to Q₈ (in black) and 4-HP₈ (in gray) after HPLC analysis of lipid extracts from Δ ubil cells containing an empty vector, pBAD-ubil, or pBAD-ubil(G301A/N303D) ($n = 4$). The ratio of the area of the Q₈ and 4-HP₈ peaks is indicated.

steric effect from the G301A mutation and the substitution of a hydrogen-bond stabilization by a repulsive electrostatic interaction resulting from the N303D mutation, both predicted to substantially affect the binding of FAD.

DISCUSSION

By using a combination of genetic, biochemical, and structural approaches, we have established that *visC*, a gene of unknown function in *E. coli*, encodes a protein that plays an important role in coenzyme Q biosynthesis under aerobic conditions. Consequently, we have renamed this gene *ubil*. We show here that the UbiL protein functions in the C5-hydroxylation reaction of aerobic Q biosynthesis in *E. coli*.

More precisely, the function of the UbiL protein is to introduce the OH group on the C5 carbon of the phenyl ring of

ubiquinone as supported by several lines of evidence. First, 4-HP₈ that accumulates in Δ ubil cells is diagnostic of a deficiency in the C5-hydroxylation reaction. Indeed, 4-HP₈ results from decarboxylation of OHB (reaction *b*, Fig. 1) to form OPP, which is then hydroxylated at position C1 (reaction *e*) without C5-hydroxylation (reaction *c*) and O5-methylation (reaction *d*) taking place. Likewise, we have shown that *S. cerevisiae* strains deficient for the C5-hydroxylation accumulate 4-HP₆ (17, 20). Second, UbiL complements the C5-hydroxylation defect of Δ coq6 *S. cerevisiae* cells (Fig. 3), which shows that UbiL is a functional ortholog of the C5-hydroxylase Coq6. Given the modest sequence identity between UbiL and Coq6 (25%) and the fact that Coq proteins are organized in a multiprotein complex (3), it is not surprising that UbiL does not fully complement the deletion of *coq6* (Fig. 3C). Third, we have established that

UbiI displays a number of characteristics of FAD-dependent monooxygenases: (i) it shows high sequence homology with members of this class of enzymes, including the well studied PHBH and also UbiH, UbiF, and Coq6 (supplemental Fig. S1); (ii) the crystal structure of UbiI_{tr} shows great structural homology with PHBH, including at the level of a binding pocket for a FAD cofactor, as confirmed by docking experiments; (iii) Gly-301 and Asn-303, which contribute to the FAD binding pocket, are important for the C5-hydroxylase activity of UbiI. On the basis of these results, we propose that UbiI is a FAD-dependent monooxygenase that catalyzes the O₂-dependent C5-hydroxylation reaction of coenzyme Q₈ biosynthesis in aerobic conditions.

It should be noted that very few Ubi proteins involved in Q₈ ring modification have been characterized biochemically, maybe as a result of limited stability and solubility when these proteins are expressed individually, as encountered with UbiI. In fact, only the purified O-methyltransferase UbiG has been shown to display *in vitro* activity so far (6). In the case of UbiI, we had to work with a truncated form lacking 34 amino acids in the C terminus to obtain a homogeneous protein in solution that we could crystallize. Unfortunately, this protein was inactive when assayed *in vivo* and could not bind FAD *in vitro*. Further studies are required to obtain a pure active UbiI enzyme. Nevertheless, our structure of UbiI is the first x-ray crystal structure of a monooxygenase implicated in Q biosynthesis.

A fascinating question raised by our work concerns the role of UbiB in Q biosynthesis. We clearly show that UbiI is responsible for the C5-hydroxylation reaction, and therefore UbiB is not catalyzing this step as this has been thought for years (4). An attractive possibility is that UbiB functions in regulating Q₈ biosynthesis via its putative kinase activity as originally proposed by Clarke and co-workers (12). If so, the function of UbiB would be consistent with the emerging function of its eukaryotic homologs from *S. cerevisiae* (Coq8) (23) and humans (ACDK3/CABC1) (30).

Our characterization of *ubiI* yielded intriguing observations regarding the hydroxylation reactions. First, inactivation of *ubiI* does not completely abrogate Q₈ biosynthesis. We have shown that in the absence of UbiI, the C6 monooxygenase UbiF is able to hydroxylate the neighboring C5, which points to a relatively poor regioselectivity of UbiF. However, there is no doubt that the main C5-hydroxylase is UbiI and not UbiF because UbiF only promotes the biosynthesis of 7% of WT Q₈ levels in Δ *ubiI* cells and because the C5-hydroxylation is not deficient in Δ *ubiF* cells because only DMQ₈ but no 4-HP₈ is detected in these cells. Second, we have shown that UbiI is dispensable for anaerobic Q₈ biosynthesis similarly to what was reported for UbiH and UbiF (22). As dioxygen is the source of the three oxygen atoms that are incorporated during the aerobic hydroxylation reactions (reactions c, e, and g, Fig. 1) of Q₈ biosynthesis (31), the flavin-dependent monooxygenases UbiF, UbiH, and UbiI do not function in anaerobic conditions. Therefore, an alternative unidentified enzymatic system must substitute for UbiI, UbiF, and UbiH to catalyze the hydroxylation reactions during anaerobic Q₈

biosynthesis. The next challenge will be to identify the anaerobic hydroxylation system.

Acknowledgments—We thank Christophe Velours and Laila Sago for performing the SEC-MALLS and mass spectrometry analysis on the IMAGIF platform, Dimitri Ch  rier for technical assistance, and Djemel Hamdane for fruitful discussions. We thank SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities and Beatriz Guimaraez for assistance in using beamline PROXIMA 1. We thank Dr. Nassos Typas (EMBL, Heidelberg) and Prof. Carol Gross (University of California, San Francisco) for sharing unpublished results at the beginning of this study.

REFERENCES

- Nowicka, B., and Kruk, J. (2010) Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1587–1605
- Bentinger, M., Tekle, M., and Dallner, G. (2010) Coenzyme Q: biosynthesis and functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 74–79
- Tran, U. C., and Clarke, C. F. (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* **7**, S62–71
- Meganathan, R. (2001) Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 131–139
- Gulmezian, M., Hyman, K. R., Marbois, B. N., Clarke, C. F., and Javor, G. T. (2007) The role of UbiX in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 144–153
- Poon, W. W., Barkovich, R. J., Hsu, A. Y., Frankel, A., Lee, P. T., Shepherd, J. N., Myles, D. C., and Clarke, C. F. (1999) Yeast and rat Coq3 and *Escherichia coli* UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 21665–21672
- Lee, P. T., Hsu, A. Y., Ha, H. T., and Clarke, C. F. (1997) A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the *Escherichia coli* *ubiE* gene. *J. Bacteriol.* **179**, 1748–1754
- Kwon, O., Kotsakis, A., and Meganathan, R. (2000) Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of the *ubiF* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 157–161
- Nakahigashi, K., Miyamoto, K., Nishimura, K., and Inokuchi, H. (1992) Isolation and characterization of a light-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone. *J. Bacteriol.* **174**, 7352–7359
- van Berkel, W. J., Kamerbeek, N. M., and Fraaije, M. W. (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**, 670–689
- Cox, G. B., Young, I. G., McCann, L. M., and Gibson, F. (1969) Biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli* K-12: location of genes affecting metabolism of 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoic acid and 2-octaprenylphenol. *J. Bacteriol.* **99**, 450–458
- Poon, W. W., Davis, D. E., Ha, H. T., Jonassen, T., Rather, P. N., and Clarke, C. F. (2000) Identification of *Escherichia coli* *ubiB*, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 5139–5146
- Hsu, A. Y., Poon, W. W., Shepherd, J. A., Myles, D. C., and Clarke, C. F. (1996) Complementation of *coq3* mutant yeast by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry* **35**, 9797–9806
- Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., López, L. C., Quinzii, C. M., Assoum, M., Drouot, N., Busso, C., Makri, S., Ali-Pacha, L., Benhassine, T., Anheim, M., Lynch, D. R., Thibault, C., Plewniak, F., Bianchetti, L., Tranchant, C., Poch, O., DiMauro, S., Mandel, J. L., Barros, M. H., Hirano, M., and Koenig, M. (2008) ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q₁₀ deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 661–672
- Entsch, B., Cole, L. J., and Ballou, D. P. (2005) Protein dynamics and electrostatics in the function of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch.*

- Biochem. Biophys.* **433**, 297–311
16. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008
 17. Ozeir, M., Mühlenhoff, U., Webert, H., Lill, R., Fontecave, M., and Pierrel, F. (2011) Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. *Chem. Biol.* **18**, 1134–1142
 18. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* **229**, 105–124
 19. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461
 20. Pierrel, F., Hamelin, O., Douki, T., Kieffer-Jaquinod, S., Mühlenhoff, U., Ozeir, M., Lill, R., and Fontecave, M. (2010) Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. *Chem. Biol.* **17**, 449–459
 21. Shestopalov, A. I., Bogachev, A. V., Murtazina, R. A., Viryasov, M. B., and Skulachev, V. P. (1997) Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*: evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett.* **404**, 272–274
 22. Alexander, K., and Young, I. G. (1978) Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **17**, 4750–4755
 23. Xie, L. X., Ozeir, M., Tang, J. Y., Chen, J. Y., Jaquinod, S. K., Fontecave, M., Clarke, C. F., and Pierrel, F. (2012) Overexpression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq-null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the coenzyme Q6 biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **287**, 23571–23581
 24. Holm, L., and Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **38**, W545–549
 25. Schreuder, H. A., Prick, P. A., Wierenga, R. K., Vriend, G., Wilson, K. S., Hol, W. G., and Drenth, J. (1989) Crystal structure of the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 Å resolution: analysis of the enzyme-substrate and enzyme-product complexes. *J. Mol. Biol.* **208**, 679–696
 26. Xia, C., Hamdane, D., Shen, A. L., Choi, V., Kasper, C. B., Pearl, N. M., Zhang, H., Im, S. C., Waskell, L., and Kim, J. J. (2011) Conformational changes of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase are essential for catalysis and cofactor binding. *J. Biol. Chem.* **286**, 16246–16260
 27. Correll, C. C., Batie, C. J., Ballou, D. P., and Ludwig, M. L. (1992) Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science* **258**, 1604–1610
 28. Boyd, J. M., Endrizzi, J. A., Hamilton, T. L., Christopherson, M. R., Mulder, D. W., Downs, D. M., and Peters, J. W. (2011) FAD binding by ApbE protein from *Salmonella enterica*: a new class of FAD-binding proteins. *J. Bacteriol.* **193**, 887–895
 29. Palfey, B. A., Entsch, B., Ballou, D. P., and Massey, V. (1994) Changes in the catalytic properties of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase caused by the mutation Asn300Asp. *Biochemistry* **33**, 1545–1554
 30. Xie, L. X., Hsieh, E. J., Watanabe, S., Allan, C. M., Chen, J. Y., Tran, U. C., and Clarke, C. F. (2011) Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1811**, 348–360
 31. Alexander, K., and Young, I. G. (1978) Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **17**, 4745–4750

3- Discussion

La voie de biosynthèse de Q₈ chez *Escherichia coli* contient 3 réactions d'hydroxylation décrites pour être catalysées par UbiB, UbiF et UbiH (**Alexander and Young 1978a**). Une ambiguïté entourait le rôle d'UbiB, une protéine kinase proposée comme étant impliquée dans la réaction d'hydroxylation en C5. Nous avons pu résoudre cette ambiguïté en montrant que la protéine UbiI (VisC) catalyse cette réaction d'hydroxylation.

Un mutant *ΔubiI* accumule un intermédiaire de biosynthèse, le 4-HP₈ (4-hydroxyphénol, figure 27).

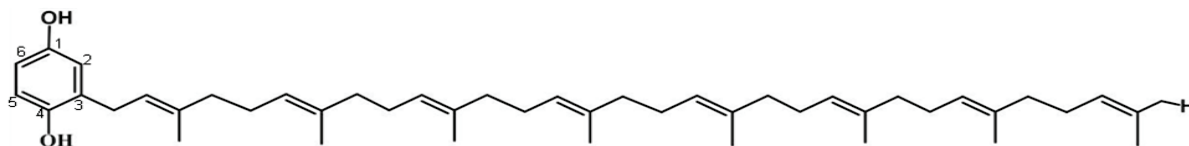


Figure 27 : Structure de 4-HP₈

Sa formation peut s'expliquer de la manière suivante en considérant l'ordre des étapes de biosynthèse : 4-HP₈ est formé par décarboxylation d'OHB (composé 2, figure 12) en C1 suivie par l'hydroxylation en C1 sans que les réactions d'hydroxylation en C5 et de méthylation en O5 n'aient lieu. Ainsi, la réaction la plus amont de la voie de biosynthèse de Q déficiente dans le mutant *ΔubiI* est l'hydroxylation en C5. En conséquence, 4-HP₈ (et non OPP comme initialement décrit dans (**Poon et al. 2000**)) est caractéristique d'une déficience d'hydroxylation en C5 et UbiI est responsable de cette réaction. L'activité C5-hydroxylase d'UbiI a été également démontrée chez *S. cerevisiae*. En effet un mutant *Δcoq6* accumule 4-HP₆ (**Ozeir et al. 2011**) et la surexpression d'UbiI en combinaison avec Coq8 restaure la croissance de *Δcoq6* sur un milieu respiratoire (figure 3A, article). Toutefois, cette complémentation est partielle puisque la souche *Δcoq6* /Coq8-UbiI accumule seulement 12% de Q₆ par rapport à la souche *Δcoq6*/Coq6 (figure 3C, article). Ceci pourrait provenir i) du fait que Coq6 et UbiI ont seulement 25 % d'homologie de séquence et ii) d'une intégration imparfaite d'UbiI dans le complexe de biosynthèse de Q₆ formé par les protéines Coq. Face à l'instabilité de la protéine UbiI en solution, nos collaborateurs de Paris ont obtenu une forme tronquée (UbiI_{tr}) dans laquelle les 35 acides aminés de l'extrémité C-terminal sont absents. L'analyse de la structure cristallographique d'UbiI_{tr} obtenue montre une superposition quasi-parfaite avec celle de

PHBH, le prototype des monooxygénases à flavine du groupe A (**Huijbers et al. 2014**). De plus, nous avons montré que les 2 résidus conservés Gly-301 et Asn-303 d'UbiI (impliqués dans la liaison de la FAD dans PHBH), sont importants pour l'activité C5-hydroxylase d'UbiI (figure 5, article). Ainsi, même si nous n'avons pas pu montrer une activité *in vitro* d'UbiI ou sa capacité à lier la FAD, l'ensemble de nos résultats démontrent qu'UbiI est une monooxygénase à flavine qui catalyse la réaction d'hydroxylation aérobie en C5 dans la biosynthèse du coenzyme Q.

Le rôle d'UbiB, initialement proposé pour catalyser cette réaction d'hydroxylation en C5, reste inconnu à ce jour. Il a été rapporté qu'un mutant *ubiB*⁻ est déficient en Q₈ uniquement en aérobiose (**Alexander and Young 1978a**), mais nos résultats au laboratoire montrent qu'un mutant Δ *ubiB* est déficient en Q₈ dans les deux conditions aérobie et anaérobie (données non présentées). Cette différence pourrait s'expliquer i) par le fait que nous étudions un mutant de délétion d'*ubiB* et non un mutant ponctuel (non caractérisé génétiquement) comme Alexander et Young ; ii) si la mutation que les auteurs ont décrite comme *ubiB*⁻ affecte non pas *ubiB* mais le gène adjacent *ubiJ*, situé dans le même opéron (voir figure 13, introduction). En effet, *ubiJ* est important pour la biosynthèse de Q₈ uniquement dans les conditions aérobies (voir chapitre II), et son inactivation provoque donc un phénotype semblable à celui décrit pour *ubiB*⁻ en 1978. Récemment, une activité kinase a été rapportée pour ADCK3, l'homologue humain d'UbiB (**Stefely et al. 2014**). La question du substrat d'ADCK3 reste en suspens et il sera intéressant de savoir si UbiB assure la phosphorylation de protéines Ubi, tel que proposé pour son homologue Coq8 et les protéines Coq3, 5 et 7 chez *S. cerevisiae*. Puisque UbiB semble importante en aérobie et anaérobie, il serait intéressant d'évaluer l'importance de la phosphorylation pour la biosynthèse de Q₈ dans ces deux conditions de culture.

L'avancée sur le rôle d'UbiI a permis de montrer un manque de spécificité de la protéine UbiF. En effet, le mutant Δ *ubiI* accumule 7% de Q₈ ce qui reflète que l'hydroxylation en C5 s'effectue partiellement même en absence d'UbiI. Inversement, nous pouvons conclure qu'UbiI n'est pas capable d'assurer l'hydroxylation C6 en absence d'ubiF puisque le mutant Δ *ubiF* accumule DMQ₈ et ne synthétise pas de Q₈. Ainsi, il semble que la régio-sélectivité d'UbiF est moins stringente que celle d'UbiI, ceci pouvant être dû à des subtiles différences dans l'environnement des sites actifs de ces protéines. Vu la formation de 4-HP₈ dans Δ *ubiI*, on sait que l'hydroxylation en C1 peut se faire en absence du groupement méthoxyle en C5. Le caractère électronégatif du C2 apporté par le groupement méthoxyle en para (C5) est important pour la

méthylation en C2 ce qui explique l'accumulation de 4-HP₈ dans $\Delta ubiI$. En absence du groupement méthoxyle en C5, la méthylation en C2 pourrait avoir lieu quand même mais ne serait pas efficace et deviendrait donc l'étape limitante pour la biosynthèse de Q₈ dans le mutant $\Delta ubiI$. Dès que la méthylation en C2 aurait lieu, le produit pourrait être pris en charge par UbiF et donc être hydroxylé en C5 et C6 pour finalement produire du Q₈.

UbiI, UbiH et UbiF appartiennent toutes trois à la famille des monooxygénases à flavine du groupe A, en accord avec le fait que les groupements hydroxyles en C1, C5 et C6 proviennent du dioxygène comme démontré par les expériences de marquage isotopique (**Alexander and Young 1978b**). De plus, les mutants de délétion de ces monooxygénases montrent un déficit en Q₈ uniquement lorsqu'ils sont cultivés en condition aérobie (**Alexander and Young 1978a**), impliquant que ces protéines ne sont pas fonctionnelles en absence de dioxygène, un cosubstrat de la réaction d'hydroxylation. Nos résultats sur UbiI renforcent donc l'hypothèse de l'existence d'un système alternatif d'hydroxylation en condition anaérobie pour remplacer les 3 protéines UbiH, UbiF et UbiI et assurer la biosynthèse de Q₈ en anaérobie (voir chapitre IV).

Chapitre II : UbiJ (YigP) et UbiK (YqiC) sont deux nouveaux acteurs de biosynthèse aérobique de Q₈

1- Mise en évidence des protéines YqiC et YigP :

YqiC est une protéine de 96 acides aminés qui ne présente pas de séquence signature connue et dont on ne connaît pas la fonction. D'après l'analyse du « paysage phénotypique » (<http://ecoliwiki.net/tools/chemgen/>) d'*E. coli* (Nichols *et al.* 2011), nous avons remarqué que des souches mutantes *ΔyqiC* et *ΔubiI* montraient une sensibilité commune à de nombreux produits chimiques (pyocyanine, benzalkonium, mecillinam, phenazine methosulfate). Ceci est souvent caractéristique de l'implication des gènes dans la même voie cellulaire. Une publication récente (Carrica *et al.* 2011) montre qu'YqiC est essentielle à la virulence de *Salmonella typhimurium* chez des souris infectées, et que cette protéine est dotée d'une activité fusogénique des membranes qui pourrait permettre à la bactérie de coloniser les cellules des souris.

yigP est un gène localisé en opéron entre *ubiB* et *ubiE* (figure 13). En 2012, une étude a montré qu'YigP est essentielle pour *E.coli*. Plus précisément, c'est un ARN de 252 nucléotides nommé *esre* (pour essential small RNA in *E.coli*) et contenu dans la partie C-terminale du gène *yigP* qui a été proposé pour être essentiel (Chen *et al.* 2012a). Vu sa localisation en opéron avec deux autres gènes essentiels pour la biosynthèse de Q₈, nous nous sommes intéressés à *yigP* pour étudier son importance pour la biosynthèse de Q₈ chez *E. coli*.

Les résultats avec YigP que nous avons renommé par la suite UbiJ ont été publiés dans *Journal of Bacteriology* en 2014 (Aussel, Loiseau, *et al.* 2014). Les expériences mentionnées dans cet article ont été réalisées en grande partie chez *S. typhimurium* mais nous avons également démontré l'importance d'YigP pour la biosynthèse de Q₈ chez *E. coli*. Dans ce chapitre, je décris les résultats auxquels j'ai contribué. L'article sur UbiJ est disponible dans l'annexe 2 de ce manuscrit.

2- YqiC et YigP sont essentielles pour la biosynthèse aérobique de Q₈

Notre collaborateur à Marseille, Laurent Loiseau, a construit des souches d'*E. coli* $\Delta yqiC$ et $\Delta ubiJ$ dans lesquelles l'ORF des gènes *ubiJ* et *yqiC* a été remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine. Il est important de noter que Chen *et al.* n'ont pas réussi à faire le mutant $\Delta ubiJ$ et ont décrit l'inactivation du gène *ubiJ* comme étant létal pour la bactérie *E. coli* (Chen *et al.* 2012b). En revanche, Laurent Loiseau a réussi à construire ce mutant qui est viable mais pousse mal dans un milieu riche LB. La souche $\Delta yqiC$ présente une croissance comparable à la souche WT en milieu riche LB en conditions aérobies alors que le mutant $\Delta ubiJ$ montre une déficience de croissance importante (figure 28A).

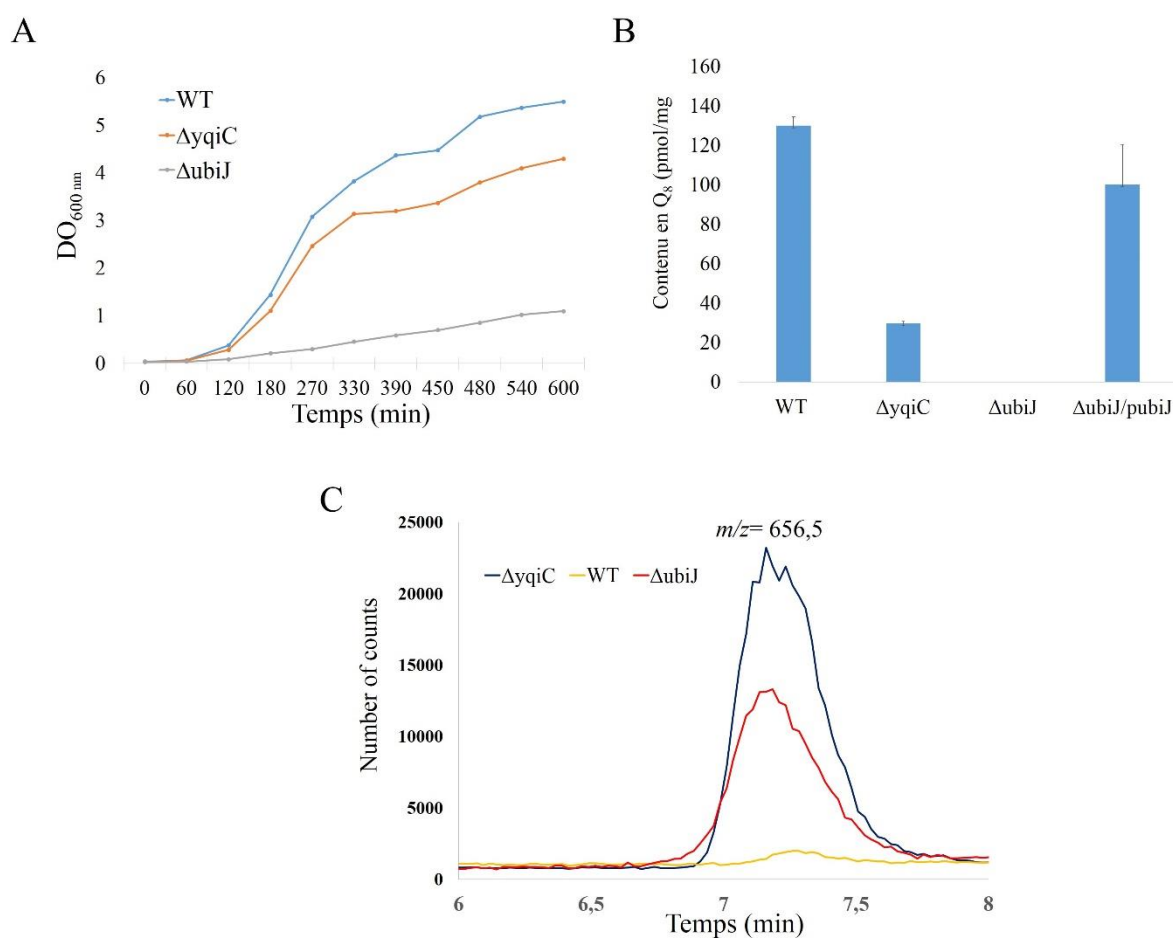


Figure 28 : $\Delta yqiC$ et $\Delta ubiJ$ accumulent de l'OPP. (A) Les souches WT, $\Delta ubiJ$ et $\Delta yqiC$ ont été cultivées pendant une nuit puis diluées le lendemain à un DO_{600nm}=0,05 dans du milieu riche LB et cultivées à 37°C en conditions aérobies. La croissance a été suivie par la mesure du DO à 600 nm. (B) Quantification du taux de Q₈ par mg de matière fraîche, n=3. (C) Un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1mg de cellules des souches WT, $\Delta ubiJ$ et $\Delta yqiC$ est analysé par HPLC-MS. Le chromatogramme représente le nombre de coups enregistrés par le spectromètre de masse à une masse $m/z = 656,5$ correspondant à la masse de l'OPP avec un induit ammonium en fonction du temps d'élution.

L'analyse du contenu en quinones par HPLC-ECD (voir partie matériels et méthodes) des souches cultivées en aérobie montre que le mutant *ΔyqiC* a un contenu diminué d'environ 80% par rapport à une souche WT tandis qu'un mutant *ΔubiJ* ne biosynthétise que 1% de Q₈ en comparant à une souche WT (figure 28B). La délétion d'*ubiJ* n'a pas d'effet polaire sur le gène *ubiB* puisqu'un plasmide contenant le gène *ubiJ* rétablit un contenu de Q₈ WT dans la souche *ΔubiJ* (figure 28B). Ces résultats montrent que les gènes *ubiJ* et *yqiC* sont essentiels pour la biosynthèse aérobique de Q₈. Le contenu en DMK₈ et MK₈ des souches *ΔubiJ* et *ΔyqiC* n'est pas profondément affecté par rapport à une souche WT (données non montrées) ce qui suggère que la délétion des gènes *ubiJ* et *yqiC* impacte le métabolisme de Q₈ mais pas la biosynthèse de DMK₈/MK₈. Nous avons ensuite analysé les extraits lipidiques de ces deux souches par HPLC couplée à un spectromètre de masse. La figure 28C montre le chromatogramme pour l'ion de masse $m/z=656,5$ qui correspond à la masse de l'octaprénylphénol (OPP) avec un adduit ammonium. Le temps de rétention ainsi que le spectre UV-visible (non montré) du produit éluant à 7.2 min sont en accord avec ceux de l'OPP. Les résultats montrent que les deux souches accumulent une quantité importante d'OPP par rapport à une souche WT. L'OPP s'accumule également dans les mutants *ΔubiG* et *ΔubiB* (Poon *et al.* 2000; Poon *et al.* 1999) et ne constitue donc pas un intermédiaire caractéristique d'une déficience d'une étape de biosynthèse bien précise. De plus, toutes les protéines ayant un rôle catalytique dans la voie de biosynthèse de Q₈ en aérobie sont connues, donc nous ne pensons pas que les protéines YqiC et UbiJ catalysent une réaction chimique particulière dans la voie de biosynthèse de Q₈ mais qu'elles jouent un rôle plus général dans cette voie métabolique.

Puisque le défaut de biosynthèse de Q₈ de la souche *ubiI*- est spécifique à des conditions de croissance aérobie (chapitre I), nous avons voulu vérifier le contenu en Q₈ des souches *ΔyqiC* et *ΔubiJ* après culture en anaérobie. Ainsi, les souches WT, *ΔyqiC*, *ΔubiJ*, ont été cultivées dans des conditions anaérobies et le contenu en Q₈ a ensuite été quantifié (figure 29).

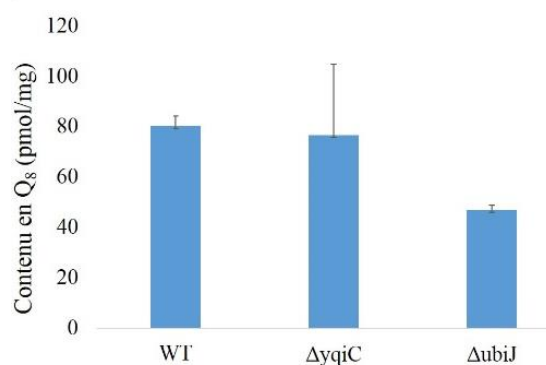


Figure 29 : Contenu en Q₈ des souches WT, ΔyqiC, ΔubiJ cultivées en conditions anaérobies : Les différentes souches sont cultivées dans du milieu riche LB. Un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1 mg de cellules cultivées en anaérobiose est analysé par HPLC-ECD. Quantification du taux de Q₈ par mg de matière fraîche, n=3.

La biosynthèse de Q₈ est rétablie à un taux WT dans le mutant ΔyqiC et à 60% dans le mutant ΔubiJ en comparant à une souche sauvage WT (figure 29). Ces résultats montrent que les 2 gènes *ubiJ* et *yqiC* sont importants pour la biosynthèse de Q₈ en conditions aérobies mais sont en partie dispensables dans des conditions anaérobies. Dans la suite de ce manuscrit, **yqiC est renommé ubiK** vu son importance pour la biosynthèse aérobie de Q₈.

3- Expression d'UbiJ et d'UbiK en aérobie /anaérobie :

Vu l'importance des protéines UbiJ et UbiK pour la biosynthèse de Q₈ uniquement en aérobie, nous avons étudié l'expression de ces protéines dans les deux conditions de culture (en présence et en absence de dioxygène). Les 2 protéines sont étiquetées par un tag SPA et les deux souches UbiJ-SPA et UbiK-SPA sont cultivées dans du milieu LB. Nous avons démontré que le tag SPA n'affecte pas l'activité de la protéine (voir l'étude détaillée dans le chapitre III). La détection des protéines se fait après migration des extraits cellulaires totaux sur gel SDS-PAGE suivie par western blot grâce à un anticorps anti-flag.

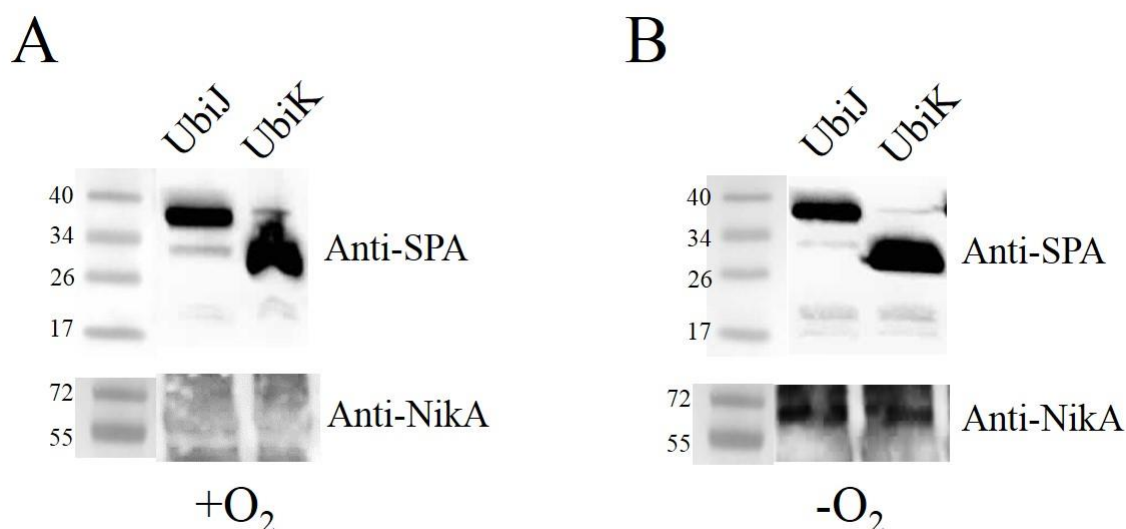


Figure 30 : Expression des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA : Western blot des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA à partir des extraits cellulaires totaux de cultures effectuées en aérobiose (+O₂) ou anaérobiose (-O₂). La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag. La quantité déposée sur gel SDS-PAGE est normalisée en fonction de la DO de la culture. L'anaérobiose a été vérifiée par utilisation du contrôle NikA qui est exprimée uniquement en absence d'oxygène. La détection de la protéine NikA se fait sur la même membrane que celle utilisée pour la détection avec l'anticorps anti-flag suite au stripping et à l'incubation avec des anticorps polyclonaux anti-NikA.

Nous avons utilisé comme contrôle la protéine NikA qui est exprimée uniquement dans les conditions anaérobies (de Pina *et al.* 1995). Nos résultats montrent que NikA est détectée uniquement dans les cellules cultivées en anaérobiose alors que les protéines UbiJ et UbiK sont détectées à des niveaux comparables en présence ou en absence de dioxygène (figure 30). Ainsi, même si ces protéines ne sont pas essentielles pour la biosynthèse anaérobie de Q₈, elles sont exprimées en absence d'oxygène.

4- Les 50 acides aminés terminaux d'UbiJ sont importants pour la biosynthèse de Q₈ chez *S. typhimurium* et *E. coli* :

Les bactéries *E. coli* et *S. typhimurium* sont phylogénétiquement très proches et UbiJ d'*E. coli* a 86% d'identité de séquence avec UbiJ de *S. typhimurium*.

La protéine UbiJ est formée de 2 domaines : à l'extrémité N-terminale, il y a un domaine de liaison aux lipides (de l'acide aminé 3 à l'acide aminé 120) et à l'extrémité C-terminale se trouve un autre domaine (de l'acide aminé 121 à l'acide aminé 201) (figure 31A). Afin de vérifier quelle séquence minimale d'UbiJ chez *S. typhimurium* est importante pour une activité

optimale de cette protéine, Laurent Loiseau a cloné l'extrémité N-terminale et 3 fragments de l'extrémité C-terminale de longueurs différentes (figure 31A) dans un vecteur inducible à l'arabinose.

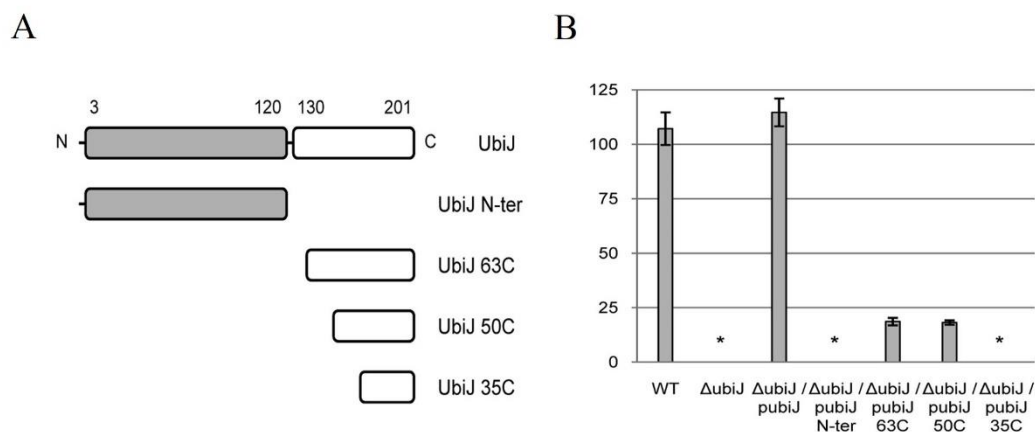


Figure 31 : Les 50 acides aminés terminaux sont suffisants pour la biosynthèse de Q₈ : (A) Représentation schématique des différentes constructions plasmidiques utilisées. UbiJ N-ter représente le plasmide codant pour les 120 acides aminés de l'extrémité N-terminale. UbiJ 63C, 50C et 35 C sont les plasmides codant pour les 63, 50 et 35 acides aminés de l'extrémité C-terminale. (B) Quantification du taux de Q₈ dans les souches décrites en A et cultivées dans du LB en condition aérobie. n=3. * signifie que Q₈ n'est pas détectable.

Un mutant *ΔubiJ* de *S. Typhimurium* a été transformé avec ces différentes constructions et les souches obtenues sont mises en culture en conditions aérobies. Ensuite, un aliquot de culture est prélevé et le contenu en quinones a été analysé par HPLC-ECD (figure 31B). Les constructions avec l'extrémité N-terminale ou avec les 35 derniers acides aminés ne permettent pas la biosynthèse de Q₈. Par contre, les plasmides codant pour les 50 et 63 acides aminés terminaux permettent une restauration partielle de la biosynthèse de Q₈. En effet, ces constructions permettent une biosynthèse de 17% de Q₈ en comparant avec la séquence complète d'UbiJ qui permet de rétablir un taux WT de Q₈. Ces résultats montrent que les 50 derniers acides aminés sont suffisants pour une activité minimale d'UbiJ chez *S. typhimurium*. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour les 50 acides aminés terminaux d'*E.coli*. En effet, un plasmide codant pour les 50 derniers acides aminés a la capacité de restaurer la croissance d'un mutant *ΔubiJ* d'*E. coli* en aérobiose (figure 32A) et de rétablir partiellement la biosynthèse de Q₈ (figure 32B). L'ensemble de ces résultats montrent que les 50 acides aminés terminaux d'UbiJ sont suffisants pour assurer une biosynthèse minimale de Q₈ dans les 2 organismes étudiés.

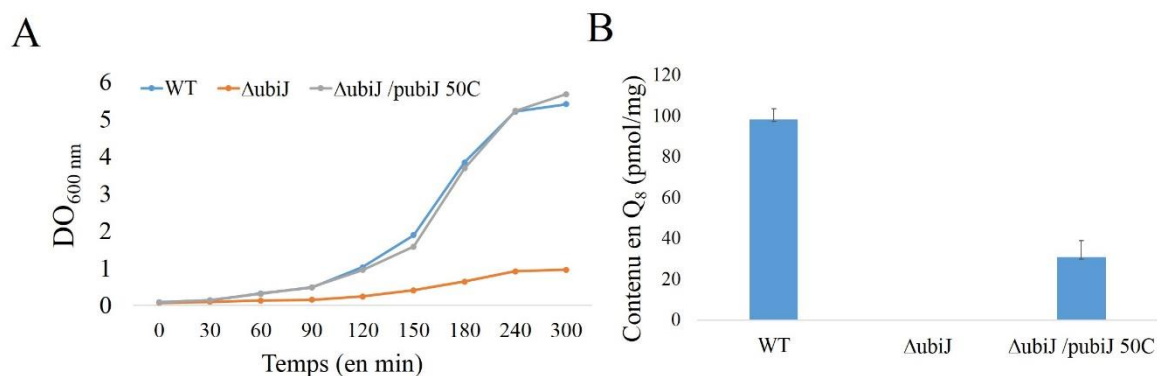


Figure 32 : Les 50 acides aminés terminaux sont suffisants pour la biosynthèse de Q₈ chez *E. coli*. (A) Les souches WT, $\Delta ubiJ$ et $\Delta ubiJ$ /pubiJ 50C ont été cultivées pendant une nuit puis dilués le lendemain à un DO_{600nm}=0,05 dans du milieu riche LB et cultivées à 37°C en conditions aérobies. La croissance a été suivie par mesure du DO à 600 nm. (B) Quantification du taux de Q₈ par mg de matière fraîche, n=3.

5- L'activité biologique d'*ubiJ* de *S. typhimurium* nécessite la synthèse d'une protéine :

Il a été récemment proposé que le gène *ubiJ* code dans sa partie C-terminale un ARN essentiel pour *E. coli* nommé *esre* (Chen *et al.* 2012a). Afin de savoir si la séquence minimale requise pour l'activité d'UbiJ (50C) est un ARN ou une séquence peptidique, Laurent Loiseau a introduit des mutations dans le codon qui suit la méthionine afin de modifier le cadre de lecture d'un seul nucléotide (50C+1) ou de deux nucléotides (50C+2) (figure 33A). La transformation du mutant $\Delta ubiJ$ de *S. typhimurium* par le plasmide 50C permet la biosynthèse de Q₈ alors que les souches transformées par les plasmides 50C+1 et 50C+2 sont toujours déficientes en Q₈ (figure 33B).

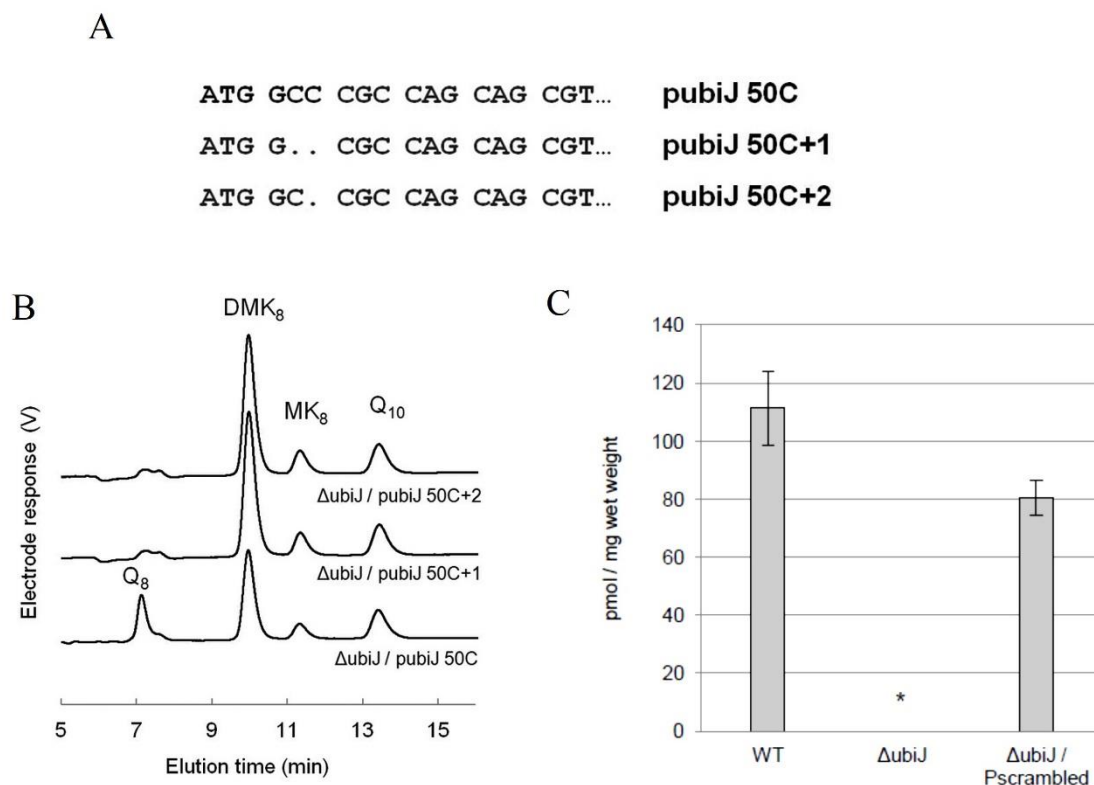


Figure 33: L'activité biologique d'*ubiJ* chez *S. typhimurium* dépend de la synthèse d'une protéine : (A) Représentation schématique de l'extrémité 5' du plasmide pubiJ 50C. Les mutations sont introduites après la méthionine pour assurer la modification du cadre de lecture d'un nucléotide (50C+1) ou de 2 nucléotides (50C+2). **(B)** Les souches $\Delta ubiJ$ transformées avec les constructions décrites en A sont cultivées dans du LB en présence d'arabinose. Un aliquot d'extract lipidique correspondant à 2 mg de cellules est analysé par HPLC-ECD. Les pics correspondants au standard interne Q_{10} , à Q_8 , DMK_8 et MK_8 sont indiqués sur les électrochromatogrammes.

Ensuite, Laurent Loiseau a construit un plasmide codant pour UbiJ dans lequel 30% des 261 nucléotides de la partie C-terminale ont été mutés sans que ces mutations n'affectent la séquence peptidique. Ce plasmide est capable de restaurer la biosynthèse de Q_8 chez un mutant $\Delta ubiJ$ de *Salmonella* (figure 33C). L'ensemble de ces résultats démontrent que l'activité biologique d'*ubiJ* repose sur une séquence peptidique et pas sur un ARN. Cette approche n'a pas été testée chez *E. coli* mais nous pensons que l'activité biologique d'UbiJ est également assurée par une protéine chez cet organisme et nous avons démontré l'importance de ces 50 acides aminés terminaux.

6- Effet de la mutation d'UbiK dans des mutants Δubi :

La mutation de certains gènes *ubi* entraîne l'accumulation d'un intermédiaire de biosynthèse de Q_8 : $DDMQ_8$ dans le cas de $\Delta ubiE$, DMQ_8 dans le cas de $\Delta ubiF$ et $4-HP_8$ dans le cas de $\Delta ubiI$. Dans d'autres mutants, la biosynthèse de Q_8 se poursuit mais celle-ci est réduite

par rapport à une souche sauvage (mutants *ΔubiC*, *ΔubiD* et *ΔubiX*). Dans le cas de *ΔubiH* et *ΔubiG*, seul l'OPP est détecté dans nos conditions de chromatographie avec déficience totale de biosynthèse de Q₈. Afin de voir l'effet de délétion d'*ubiK* sur l'accumulation de ces intermédiaires, Laurent Loiseau nous a construit les doubles mutants *Δubi ΔubiK* que j'ai cultivée dans un milieu riche LB puis un aliquot de culture est analysé par HPLC-ECD (figure 34).

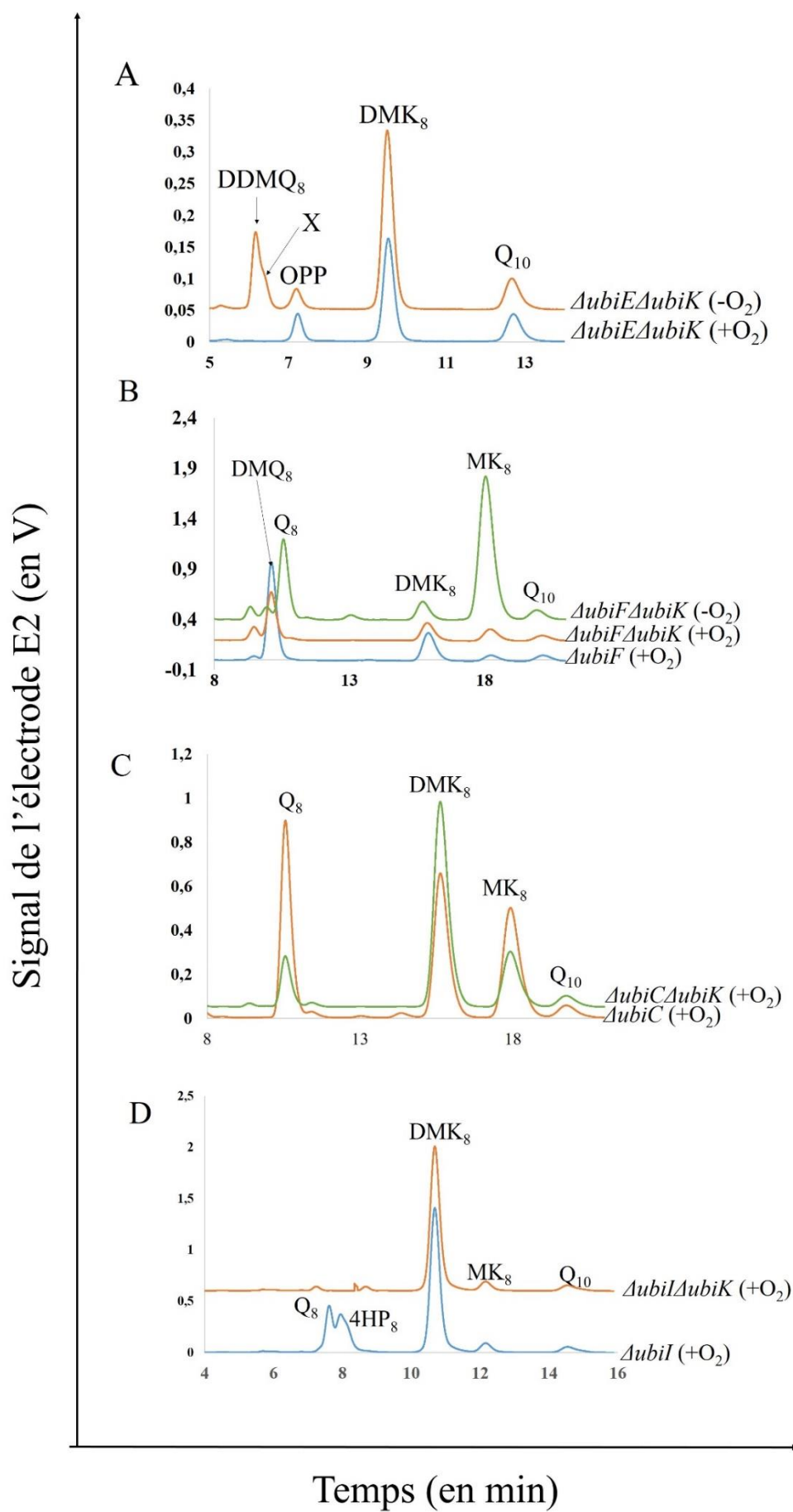


Figure 34 : Contenu en Q₈ de différentes souches: Les différentes souches sont cultivées dans du milieu riche LB en présence d'oxygène (+ O₂) ou en absence d'oxygène (- O₂). Un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1 mg de cellules est analysé par HPLC-ECD. Les pics correspondants au standard interne Q₁₀, à Q₈, DMK₈, MK₈, DDMQ₈, DMQ₈, OPP et un composé électroactif de nature inconnue (X sur la figure 34A) sont indiqués sur les électrochromatogrammes. Les électrochromatogrammes A et D ont été obtenus suite à l'analyse HPLC par la méthode A et les électrochromatogrammes B et C par la méthode B (voir matériels et méthodes).

La mutation d'*ubiE* et d'*ubiF* entraîne l'accumulation de DDMQ₈ et DMQ₈ respectivement (composé 6 et 7, figure 12). En conditions aérobies, la souche *ΔubiE ΔubiK* accumule de l'OPP mais ne produit plus du tout du DDMQ₈ tandis que DMQ₈ s'accumule dans la souche *ΔubiF ΔubiK* à environ 50% de la quantité obtenue dans la souche *ΔubiF* (figures 34A et 34B).

Les protéines UbiF et UbiK ne sont pas indispensables pour l'anaérobiose puisque les mutants *ΔubiF* et *ΔubiK* produisent du Q₈ à un taux WT en absence d'oxygène. Un mutant *ΔubiE* cultivé en absence d'oxygène accumule du DDMQ₈ mais aussi un composé de nature inconnue nommé X sur la figure 60 (noté X sur la figure 34A aussi). Nous avons testé plusieurs conditions de chromatographie pour obtenir une résolution satisfaisante de DDMQ₈ et du composé X que nous avons identifié comme étant le DQ₈ (le coenzyme Q₈ sans le groupement méthyle en C2, voir figure 60, chapitre IV). Cette étude sera détaillée dans le chapitre IV des résultats. En conditions anaérobies, la souche *ΔubiE ΔubiK* retrouve le phénotype de la souche *ΔubiE* cultivée dans les mêmes conditions et accumule le DDMQ₈ et le DQ₈, tandis que la souche *ΔubiF ΔubiK* produit un taux WT de Q₈ (figures 34A et 34B). Ceci en accord avec le caractère dispensable d'UbiK en anaérobiose.

La souche *ΔubiC* cultivée en milieu riche LB accumule un taux WT de Q₈ tandis que la souche *ΔubiC ΔubiK* a un contenu de Q₈ diminué d'environ 85% par rapport à une souche WT (figure 34C). Ce taux est comparable à celui d'une souche *ΔubiK* cultivée dans les mêmes conditions.

La souche *ΔubiI* accumule du 4-HP₈ en conditions aérobies, tandis qu'en conditions anaérobies, cette souche produit du Q₈ à un taux WT (voir chapitre I). L'accumulation de 4-HP₈ est abolie dans la souche *ΔubiI ΔubiK* cultivée en présence d'oxygène (figure 34D) ce qui indique que la protéine UbiK est indispensable pour la biosynthèse de 4-HP₈.

La délétion d'*ubiK* est donc délétère dans les mutants *ΔubiC*, *ΔubiE*, et *ΔubiI* et pas dans *ΔubiF*. En effet, la protéine UbiK est indispensable pour la production du DDMQ₈ et 4-HP₈ mais pas pour celle du DMQ₈. Ce résultat est bizarre puisque DDMQ₈ est le précurseur de DMQ₈. Il semble que dans un fond génétique *ΔubiF*, la délétion d'*ubiK* n'a que peu d'effet sur UbiE puisque DMQ₈ dérive nécessairement de DDMQ₈. Ainsi, l'effet négatif de la délétion d'*ubiK*

sur la biosynthèse aérobie pourrait être en partie annulé par la délétion d'ubiF. Cette hypothèse doit être testée en évaluant la formation de DDMQ₈ dans un triple mutant $\Delta ubiE\Delta ubiF\Delta ubiK$. Si cette hypothèse est valide, ce triple mutant devrait accumuler du DDMQ₈.

7- Fractionnement cellulaire et localisation cellulaire des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA :

Les souches UbiK-SPA et UbiJ-SPA ont été cultivées dans 1L du milieu riche LB et le culot cellulaire est ensuite lysé par presse de french. Le fractionnement cellulaire par ultracentrifugation permet de séparer les protéines solubles cytoplasmiques et périplasmiques (fraction soluble) contenus dans le surnageant des membranes internes et externes (fraction membranaire) contenus dans le culot.

7-a- choix du tampon de lyse :

4 tampons de lyse ont été utilisés pour lyser les cellules de la souche UbiK-SPA par press de French. J'ai ensuite étudié la répartition de la protéine UbiK-SPA entre fraction membranaire et fraction soluble issues du fractionnement cellulaire.

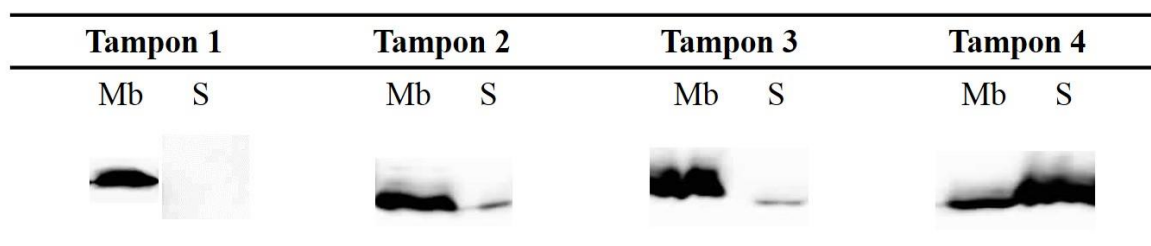


Figure 35: Choix du tampon de lyse : Western blot de la protéine UbiK-SPA à partir des fractions membranaires et solubles préparées dans 4 tampons différents. La description des tampons est donnée dans la partie « matériels et méthodes ». La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag de l'étiquette SPA. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales. Mb : fraction membranaire ; S : Fraction soluble.

La protéine UbiK-SPA est uniquement détectée dans la fraction membranaire avec le tampon 1 (figure 35) alors qu'avec les tampons 2 et 3, UbiK-SPA est majoritairement localisée dans la fraction membranaire mais est néanmoins détectable dans la fraction soluble. Avec le tampon 4, la protéine est principalement détectée dans la fraction soluble. Ainsi, la plupart des tampons

testés occasionnent une localisation d'UbiK-SPA principalement dans la fraction membranaire. En 2011, Carrica *et al.* (Carrica *et al.* 2011) détectaient la protéine UbiK à la fois dans la fraction membranaire et la fraction soluble en utilisant un tampon de lyse différent (20 mM Tris-HCl (pH 8.0) et 150 mM NaCl) ce qui montre que la composition du tampon peut influencer l'association d'UbiK à la membrane. Vu la localisation de Q₈ dans la membrane et l'importance de la protéine UbiK pour la biosynthèse de Q₈, nous avons considéré qu'une association d'UbiK avec la membrane était rationnelle et nous avons donc décidé d'utiliser le tampon 1 pour la lyse de l'ensemble des souches Ubi-SPA (voir chapitre III).

7-b- Répartition des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA :

La localisation de ces protéines Ubi (membranaire ou soluble) a été étudiée par western-blot avec un anticorps anti-flag (figure 36).

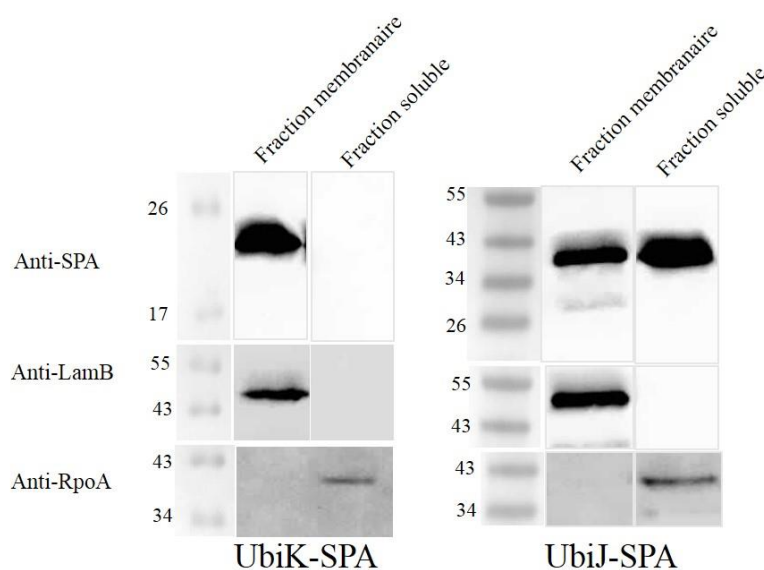


Figure 36 : Localisation des protéines Ubi-SPA : Western blot des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA à partir des fractions membranaires et solubles. La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales. LamB (protéine membranaire) et RpoA (protéine soluble) sont utilisées comme contrôle. La détection de ces 2 protéines se fait sur la même membrane que celle utilisée pour la détection avec un anticorps anti-flag suite au stripping et à l'incubation avec les anticorps polyclonaux correspondants.

Le fractionnement cellulaire a été vérifié par des anticorps polyclonaux dirigés contre LamB (protéine membranaire) et RpoA (protéine soluble). Nos résultats montrent que la protéine UbiK-SPA est uniquement associée à la membrane alors que la protéine UbiJ-SPA se répartit dans les deux fractions (figure 36).

Afin de vérifier le degré d'association des protéines UbiJ-SPA et UbiK-SPA à la membrane, j'ai testé plusieurs additifs: Le DDM (dodécyl-maltoside) est un détergent non-ionique qui solubilise les protéines intégrales ; NaCl (500 mM) est utilisé pour solubiliser les protéines qui sont en interaction électrostatique directe avec les membranes ou indirecte via des autres partenaires ; Carbonate (100 mM) est utilisé pour solubiliser les protéines périphériques en interaction avec un seul feuillet membranaire ; EDTA est utilisé pour solubiliser les protéines qui sont en interaction via des cations bivalents avec les membranes.

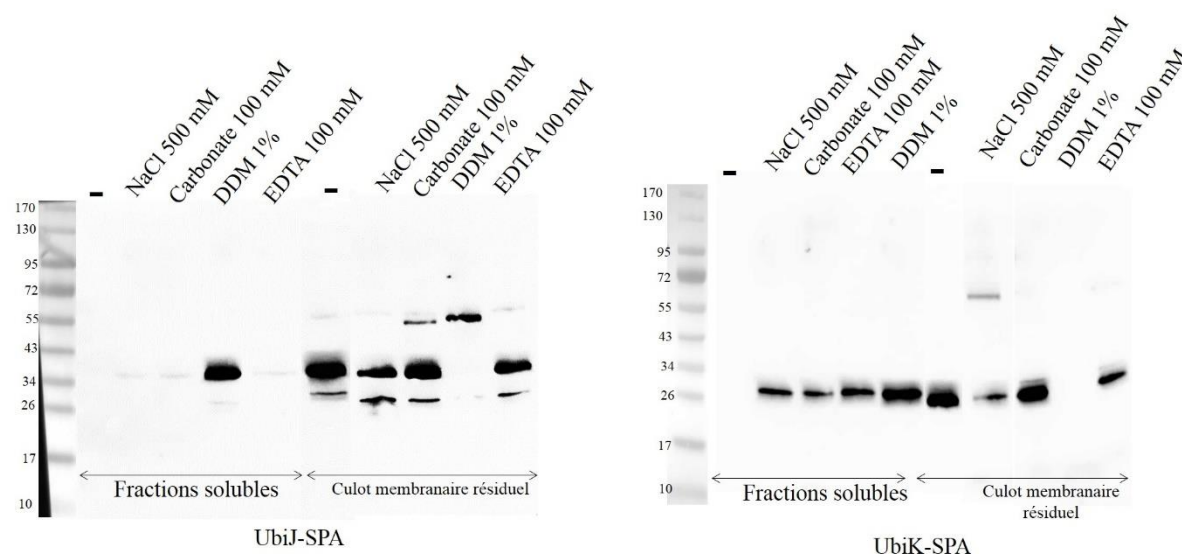


Figure 37 : tests de solubilisation des protéines associées à la membrane : Western blot des protéines UbiJ-SPA et UbiK-SPA à partir des fractions membranaires solubilisées en présence du DDM (1%), EDTA (100 mM), carbonate (100 mM) et NaCl (500 mM). La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag. Dépôt sur gel SDS-PAGE de la même quantité de 2 fractions analysées.

Dans la condition contrôle (ultracentrifugation de la fraction membranaire sans aucun ajout des produits décrits ci-dessus), les deux protéines sont détectées uniquement dans le culot membranaire résiduel (figure 37).

La protéine UbiJ-SPA est détectée uniquement dans la fraction soluble après incubation en présence du DDM. Dans les autres conditions de solubilisation, la protéine est détectée très majoritairement dans le culot membranaire résiduel (figure 37). Ceci indique que la protéine UbiJ-SPA est une protéine fortement liée à la membrane malgré l'absence de domaines transmembranaires dans sa séquence peptidique. Cependant, le fait qu'une partie de la protéine UbiJ est détectée dans la fraction soluble après fractionnement cellulaire (figure 36) suggère

que cette protéine existe à la fois sous une forme soluble et sous une forme fortement associée à la membrane.

La protéine UbiK-SPA est totalement solubilisée après incubation en présence du DDM et seulement partiellement dans les autres conditions de solubilisation (figure 37), ce qui établit néanmoins qu'UbiK n'est pas une protéine intégrale et qu'elle est plus faiblement associée à la membrane que la protéine UbiJ.

8- Localisation membranaire des protéines UbiJ et UbiK :

Nous avons ensuite étudié la localisation membranaire (membrane interne ou membrane externe) des protéines UbiJ et UbiK. Pour cela, les membranes des souches UbiJ-SPA et UbiK-SPA ont été séparées sur un gradient de sucrose de 6 couches (30% - 55% ; voir matériels et méthodes). Il est possible de séparer les deux membranes sur gradient de sucrose puisqu'elles ne possèdent pas le même contenu protéique. En effet, la membrane externe est plus riche en protéines, donc plus dense, et migre dans les couches de sucrose les plus concentrées.

Le contrôle utilisé est la protéine AtpB-SPA. AtpB fait partie de la sous-unité F₀ de l'ATP synthase située dans la membrane interne. Comme attendu, AtpB-SPA est détectée uniquement dans la fraction membranaire (figure 38A).

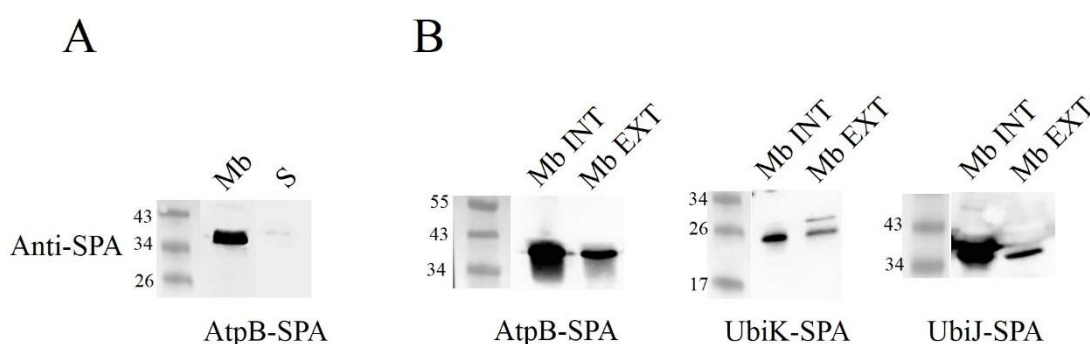


Figure 38 : UbiK et UbiJ sont associées à la membrane interne : (A) Western blot de la protéine AtpB-SPA à partir des fractions membranaires et solubles. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales. Mb : fraction membranaire ; S : fraction soluble (B) Western blot des protéines AtpB-SPA, UbiJ-SPA et UbiK-SPA à partir des fractions membranaires internes et externes séparées par gradient de sucrose. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales. Dans toutes les figures, la détection a été faite grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag. Mb INT : Membrane interne ; Mb EXT : Membrane externe.

Le signal détecté pour la protéine AtpB-SPA est prédominant dans la fraction contenant la membrane interne même si un signal est détecté dans la fraction de la membrane externe (figure 38B) ce qui reflète une contamination de la fraction membranaire externe par la fraction membranaire interne. De même, les signaux détectés pour les protéines UbiK et UbiJ sont prédominants dans la fraction membranaire interne (figure 38B). Ces résultats suggèrent que les protéines UbiJ et UbiK sont associées à la membrane interne. Toutefois, le protocole utilisé pour séparer les fractions membranaires internes et externes doit être optimisé afin de limiter la contamination de la membrane interne par la membrane externe.

Discussion

La biosynthèse de Q₈ est étudiée depuis longtemps et après notre étude récente sur UbiI, l'ensemble des protéines catalysant les différentes étapes de biosynthèse de Q₈ sont désormais connues. Dans ce chapitre, nous avons identifié *ubiJ* (*yigP*) et *ubiK* (*yqiC*) comme étant des nouveaux facteurs impliqués dans la biosynthèse aérobie de Q₈ chez *E. coli* et *S. typhimurium*. Les mutants $\Delta ubiJ$ et $\Delta ubiK$ accumulent le même intermédiaire de biosynthèse (OPP) qui n'est pas caractéristique d'une étape déficiente dans la biosynthèse de Q₈ (figure 28C). Ces résultats suggèrent que l'absence de ces gènes a un effet global sur la biosynthèse de Q₈.

Une étude récente a montré que le gène *ubiJ* est essentiel pour la viabilité d'*E. coli* et code pour une séquence ARN (Chen *et al.* 2012a). Nos résultats ne sont pas en accord avec ces observations. En effet, un mutant $\Delta ubiJ$ cultivé en aérobie montre une déficience de croissance mais il est viable dans un milieu liquide (figure 28A). De plus, nous avons montré que la séquence d'ADN codant pour les 50 derniers acides aminés permet la biosynthèse de Q₈ (figure 31) tandis que le changement de cadre de lecture d'un seul ou de deux nucléotides abolit cette biosynthèse (figure 33B). De plus, un plasmide contenant 30% de mutations de nucléotides du domaine C-terminal sans changement de la séquence peptidique est capable de compléter la biosynthèse de Q₈ dans $\Delta ubiJ$ (figure 33C). L'ensemble de ces résultats démontrent que l'activité biologique d'*ubiJ* repose sur la synthèse d'une protéine. Alors que l'importance de 50 derniers acides aminés a été démontrée chez les deux organismes, la suite de cette étude (changement du cadre de lecture et mutations silencieuses des nucléotides) doit être répétée chez la bactérie *E. coli*.

L'analyse de séquence d'UbiJ montre que le domaine C-terminal a 26% d'identité de séquence avec celui de LpxD et le domaine N-terminal a 16% d'identité de séquence avec celui de SCP2 (protéine liant les acides gras) de *Yarrowia lipolytica*. LpxD est une enzyme impliquée dans la biosynthèse du lipide A, capable d'interagir avec des composés lipidiques à travers le domaine C-terminal (**Bartling et al. 2009**). Notre hypothèse de travail est que la protéine UbiJ pourrait lier des intermédiaires de biosynthèse de Q₈ et les présenter aux protéines Ubi via ses domaines N- ou C-terminal. Toutefois, la capacité d'UbiJ à lier des lipides doit être testée *in vitro* avec des lipides. L'importance d'UbiJ pour la stabilité du complexe protéique regroupant plusieurs protéines Ubi sera évoquée dans le chapitre III.

Un mutant *ΔubiK* ne montre pas une déficience de croissance en milieu LB probablement car son contenu résiduel en Q₈ (environ 20%) est suffisant pour assurer une croissance similaire à une souche sauvage (figure 28B). Cette quantité résiduelle de Q₈ pourrait suggérer la présence d'une autre protéine jouant le même rôle qu'UbiK ou d'une fonction non-essentielle d'UbiK pour la biosynthèse de Q (comme le cas d'UbiX et d'UbiD). Récemment, la protéine SdhE a été caractérisée chez *Serratia* (**McNeil et al. 2012**). SdhE joue un rôle dans la flavinylation de la protéine SdhA, une protéine faisant partie du complexe succinate déshydrogénase (**McNeil et al. 2012**). UbiK montre 18% d'identité de séquence avec SdhE et nous suggérons qu'UbiK peut accomplir une fonction similaire à SdhE par incorporation de la flavine dans les protéines Ubi. Cette hypothèse est possible vu la présence de plusieurs Ubi à cofacteur à flavine (UbiX, UbiD, UbiI, UbiH et UbiF) et peut être testée par la mesure du taux de flavine incorporée dans ces protéines dans une souche *ΔubiK*. Alternativement, UbiK pourrait jouer un rôle dans la stabilité du complexe protéique Ubi. Cette hypothèse a été testée et les résultats sont présentés dans le chapitre III.

L'étude de fractionnement cellulaire suivie de la séparation des membranes sur un gradient de sucrose (figure 38) montre que les protéines UbiJ et UbiK sont associées à la membrane plasmique d'*E. coli*. La localisation d'UbiJ dans la fraction membranaire et la fraction soluble (figure 36) suggère que cette protéine pourrait exister sous deux formes : membranaire et soluble. Alternativement, le tampon que nous utilisons pourrait déstabiliser l'association d'UbiJ à la membrane. Cette hypothèse est possible aussi pour UbiK que nous détectons uniquement dans la fraction membranaire. En effet, Carrica et al. (**Carrica et al. 2011**) utilisaient un autre tampon de lyse pour évaluer la localisation d'UbiK et montraient qu'UbiK est en partie soluble. De plus, nos analyses protéomiques (chapitre III) montrent également la présence d'UbiK dans la fraction soluble.

Nos collaborateurs à Marseille ont pu montrer une relation entre biosynthèse de Q₈ et virulence de *S. typhimurium* (Aussel, Loiseau, *et al.* 2014). En effet, une mutation d'*ubiJ* chez *Salmonella* la rend incapable de proliférer dans les macrophages des souris, tandis que le mutant *ΔubiJ* cultivés en anaérobiose (et donc contenant du Q₈) avant l'infection des macrophages retrouve une capacité modérée à proliférer à l'intérieur des macrophages (Aussel, Loiseau, *et al.* 2014). Ces résultats établissent l'importance de Q₈ pour la prolifération bactérienne dans les macrophages et suggère une possible relation entre la biosynthèse de Q₈ et la virulence de *Salmonella*.

En conditions anaérobies, UbiK et UbiJ ne semblent pas avoir un rôle pour la biosynthèse de Q₈ puisque des mutants *ΔubiJ* et *ΔubiK* ont la capacité de biosynthétiser un taux élevé de Q₈ en anaérobiose (figure 29). Les seuls mutants de biosynthèse de Q₈ connus à ce jour, qui sont capables de produire un taux normal de Q₈ en anaérobiose sont ceux des monooxygénase (UbiF, UbiH et UbiI). Il est important de noter que dans l'étude d'Alexander et Young en 1978 (Alexander and Young 1978a), le mutant *ubiB*- est capable de former du Q₈ en anaérobiose en désaccord avec notre observation (données non montrées). Ceci suggère que le mutant *ubiB*- utilisé par ces auteurs pourrait être un mutant *ubiJ*- dont le phénotype est compatible avec leur observation. A ce stade, UbiJ et UbiK ne sont pas considérés comme des monooxygénases mais nous suggérons que ces protéines peuvent aider les monooxygénases aérobies pour leur recrutement au sein du complexe protéique comme démontré en partie dans le chapitre III.

En conclusion, nous avons démontré l'importance de 2 protéines UbiJ et UbiK pour la biosynthèse aérobie de Q₈ mais leur rôle ne semble pas être catalytique. Nous avons avancé sur leur rôle par l'analyse de la stabilité du complexe protéique de biosynthèse de Q₈ en absence de ces protéines (voir chapitre III).

Chapitre III : Regroupement des protéines Ubi en complexe protéique de haut poids moléculaire

Un axe important de la thèse a été de savoir si les protéines Ubi sont associées au sein d'un complexe protéique et éventuellement de commencer la caractérisation de ce complexe. Les protéines Ubi sont peu abondantes dans les cellules, ce qui rend leur visualisation impossible par coloration au bleu de coomassie d'un gel SDS-PAGE dans lequel des extraits cellulaires ont été séparés. Des anticorps dirigés contre des protéines Ubi ne sont pas commercialisés. Des anticorps polyclonaux anti-Ubi ont été obtenus par immunisation de lapins avec les protéines UbiK et UbiI purifiées par nos collaborateurs au Collège de France (COVALAB ©) ou avec 2 peptides de synthèse correspondant à UbiH (Invitrogen). Cependant, ces anticorps se sont révélés incapables de détecter les protéines dans des extraits totaux ou dans des fractions membranaires ou solubles. Ainsi, nous avons décidé de travailler avec des souches exprimant des protéines Ubi étiquetées par un tag SPA inséré dans le chromosome en 3' du gène. Le tag SPA dont la taille est 8 kDa a été décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Le tag SPA permet de détecter la protéine Ubi-SPA par un anticorps anti-flag en western blot et également de pouvoir la purifier par chromatographie d'affinité en 2 étapes (anti-flag puis anti-calmoduline).

1- Le tag SPA n'affecte pas l'activité des protéines Ubi :

Afin de vérifier si le tag SPA affecte ou non l'activité de différentes protéines Ubi, j'ai cultivé les souches Ubi-SPA dans un milieu LB en aérobie et un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 2 mg de cellules a été analysé par HPLC-ECD (figure 39) afin de quantifier le contenu en Q₈.

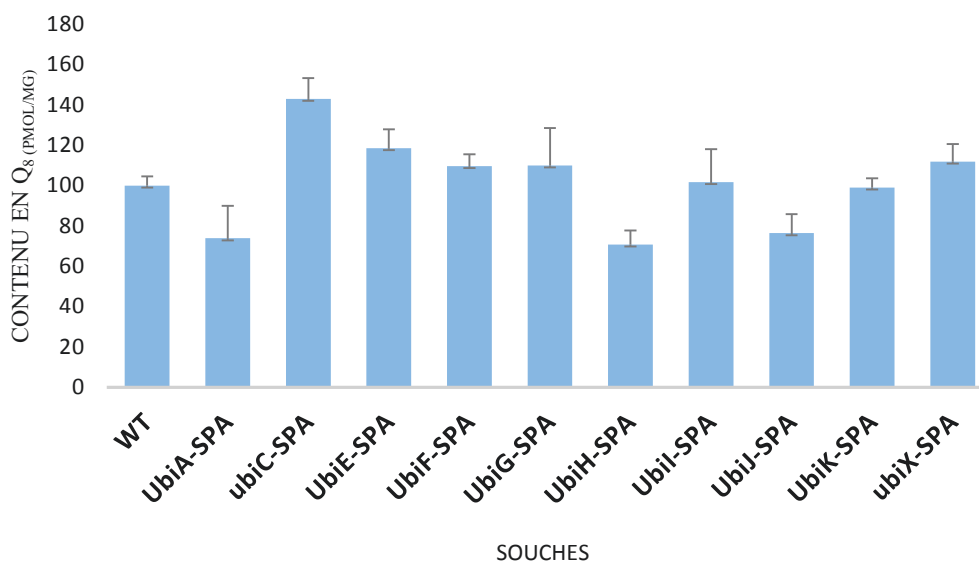


Figure 39 : Contenu en Q₈ des souches Ubi-SPA : Quantification du taux de Q₈ par mg de matière fraîche. n=3.

Le contenu en Q₈ formé par ces souches est supérieur ou égal à 70% de celui d'une souche WT ne contenant pas le tag SPA, ce qui indique que le tag SPA n'affecte pas drastiquement l'activité des protéines Ubi.

2-Détection des protéines Ubi-SPA :

Les extraits cellulaires totaux des souches Ubi-SPA ont été séparés sur gel SDS-PAGE 12%. Les protéines Ubi-SPA ont été détectées par western-blot avec un anticorps anti-flag (figure 40). Toutes les protéines sont détectées à leur taille attendue (UbiC-SPA : 34 kDa ; UbiE-SPA : 40 kDa ; UbiF-SPA : 51 kDa ; UbiG-SPA : 43 kDa ; UbiI-SPA : 53 kDa ; UbiJ-SPA : 40 kDa ; UbiK-SPA : 26 kDa ; UbiH-SPA : 50 kDa et UbiX-SPA : 34 kDa) sauf UbiB-SPA dont la taille théorique est de 71 kDa. La protéine UbiA-SPA n'a pas été détectée avec l'anticorps anti-flag pour une raison inconnue.

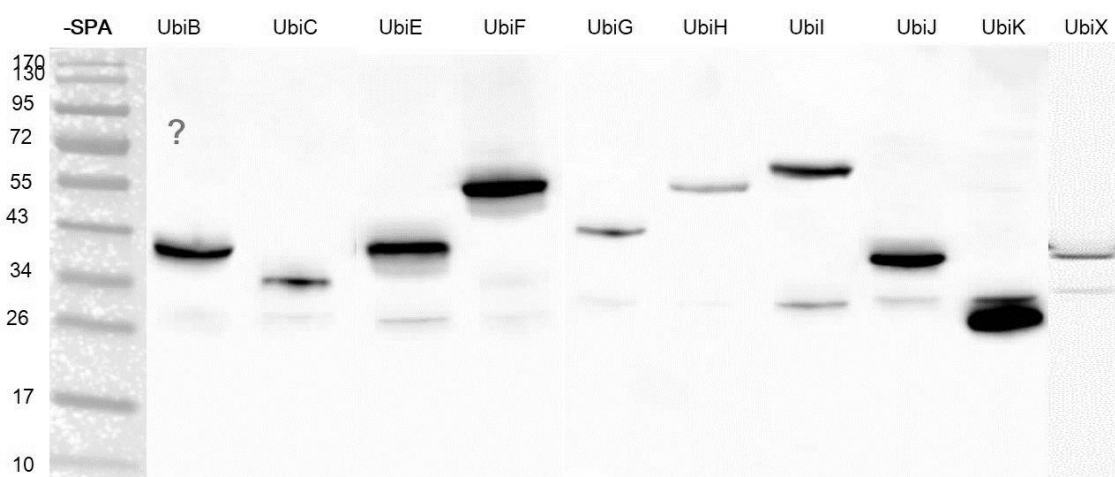


Figure 40 : Détection des protéines Ubi-SPA par un anticorps dirigé contre la séquence flag : Western blot des protéines Ubi-SPA à partir d'extraits cellulaires totaux séparés sur gel SDS 12%.

L'activité des protéines n'est donc pas affectée par la présence du tag SPA et la majorité des protéines étiquetées sont détectables par western-blot à la taille attendue. Ces souches Ubi-SPA sont donc utilisables dans les expériences de mise en évidence et de caractérisation du complexe multiprotéique.

3- Fractionnement cellulaire et localisation des protéines Ubi-SPA :

Les souches Ubi-SPA ont été cultivées dans 1L du milieu riche LB et le culot cellulaire a ensuite été lysé par presse de french puis le lysat a été fractionné par ultracentrifugation.

La localisation des protéines Ubi (membranaire ou soluble) a été étudiée par western-blot avec un anticorps anti-flag (figure 41).

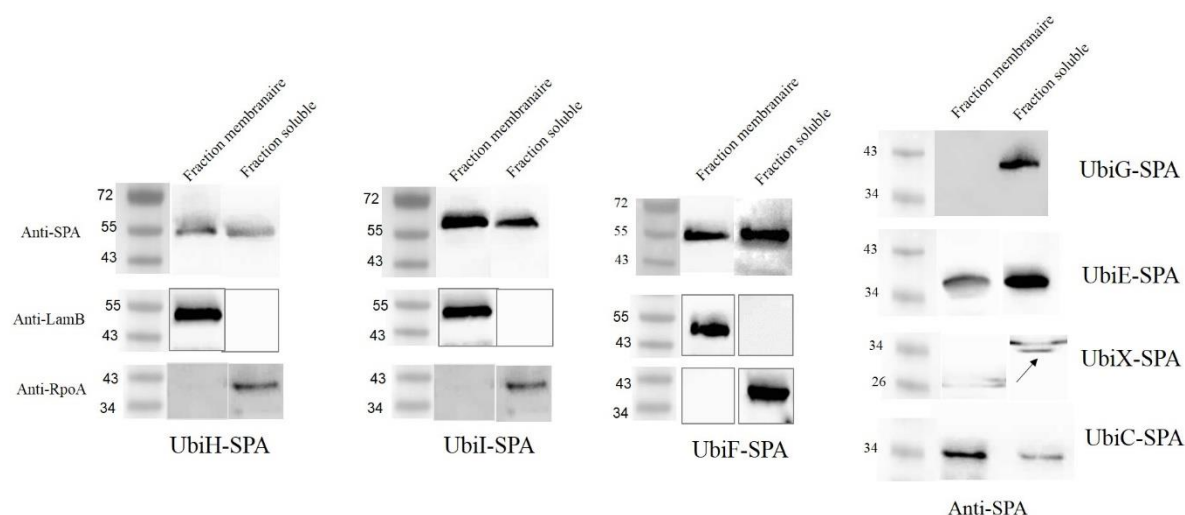


Figure 41 : Localisation des protéines Ubi-SPA : Western blot des protéines Ubi-SPA à partir des fractions membranaires et solubles. La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales. Le fractionnement a été vérifié par utilisation de 2 contrôles LamB (protéine membranaire) et RpoA (protéine soluble). La détection de ces 2 protéines se fait sur la même membrane que celle utilisée pour la détection avec un anticorps anti-flag suite au stripping et à l'incubation avec des anticorps polyclonaux correspondants.

Le fractionnement cellulaire a été vérifié en utilisant des anticorps polyclonaux contre LamB qui est une protéine membranaire intégrale et RpoA qui est une protéine soluble. Nous avons obtenus ces anticorps contrôles tardivement, ainsi nous n'avons pas les contrôles pour toutes souches Ubi-SPA (notamment UbiG, X, E et C). Nos résultats montrent que les protéines UbiG-SPA et UbiX-SPA sont détectées uniquement dans la partie soluble alors que les autres protéines Ubi(C-E-F-H-I)-SPA sont associées partiellement à la membrane (figure 41). Ces résultats ajoutés à ceux obtenus pour UbiK-SPA et UbiJ-SPA (exposés dans le chapitre II) nous permettent de conclure qu'il existe 3 cas de localisation cellulaire de protéines Ubi-SPA : membranaire (UbiK), solubles (UbiX et UbiG) et double localisation (UbiC, UbiE, UbiF, UbiH, UbiI, UbiJ).

4- Analyse des protéines Ubi membranaires :

a- tests de solubilisation :

L'analyse sur BN-PAGE des protéines associées à la membrane nécessite préalablement leur solubilisation par déstabilisation de la bicouche lipidique. Classiquement, la digitonine et le DDM (Dodécyl-maltoside) sont choisis pour leur caractère non-ionique et leur capacité à

solubiliser des complexes membranaires tout en conservant leur stabilité. Le DDM a une capacité de déstabilisation lipidique plus forte que la digitonine. La solubilisation de la fraction membranaire a été faite avec 3 concentrations différentes du DDM (Dodécyl-maltoside) (figure 42A) ou avec deux concentrations différentes de digitonine (figure 42B).

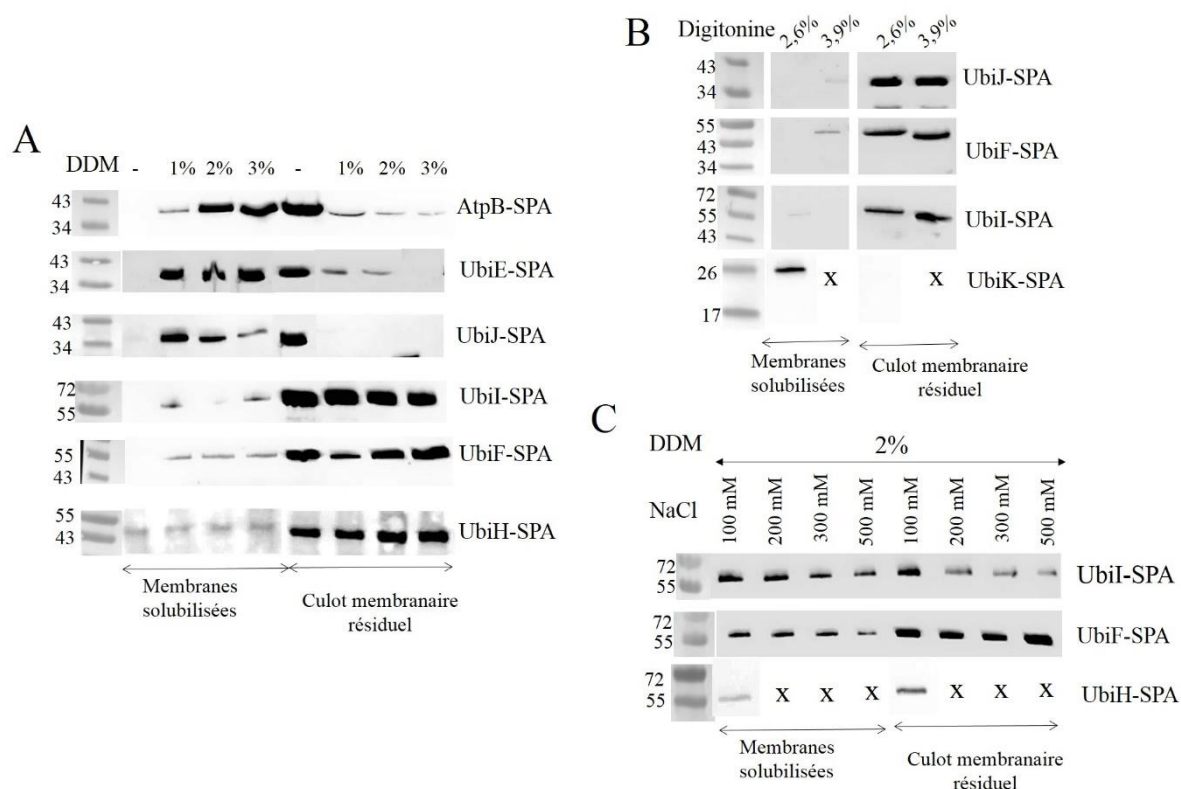


Figure 42 : tests de solubilisation des protéines Ubi associées à la membrane : (A) Western blot des protéines Ubi-SPA à partir des fractions membranaires solubilisées par 3 concentrations différentes du DDM. (B) Western blot des protéines Ubi-SPA à partir des fractions membranaires solubilisées par 2 concentrations différentes de la digitonine sauf pour UbiK-SPA qui est solubilisée par 2% seulement. Les conditions marquées par x ne sont pas faites. (C) Western blot des protéines Ubi-SPA à partir des fractions membranaires solubilisées par 2% du DDM avec 4 concentrations différentes de NaCl. Les conditions marquées par x ne sont pas faites. La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales.

Toutes les protéines sont détectées dans le culot membranaire résiduel dans la condition contrôle (sans DDM) (figure 42A). Alors que 1% de DDM est suffisant pour solubiliser les protéines UbiJ-SPA et UbiE-SPA, 2% de DDM sont nécessaires pour solubiliser la protéine AtpB-SPA (figure 42A). Les protéines UbiI-SPA, UbiF-SPA et UbiH-SPA ne sont pas solubilisées à 3% de DDM (figure 42A), mais l'ajout de NaCl permet une solubilisation partielle (figure 42C). La digitonine ne permet la solubilisation que de la protéine UbiK-SPA (figure 42B).

Suite à ces résultats, nous avons décidé d'utiliser 1% de DDM pour solubiliser les fractions membranaires des souches UbiE-SPA, UbiJ-SPA, UbiK-SPA ; 2% de DDM pour solubiliser la fraction membranaire de la souche AtpB-SPA ; 2% DDM + 100 mM NaCl pour solubiliser les protéines UbiI-SPA, UbiF-SPA et UbiH-SPA.

4-b- Analyse des fractions membranaires solubilisées sur gel BN-PAGE :

BN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) est une technique d'analyse des interactions protéine-protéine dans des conditions natives. C'est une technique rapide, et souvent utilisée comme une étape finale de purification de complexes membranaires et solubles. BN-PAGE est aussi une méthode de détermination de la masse moléculaire et la composition des complexes protéiques pré-purifiés.

En 2005, Stenberg et al. (**Stenberg *et al.* 2005**) montraient que le complexe F1-F0 est détecté à 550 kDa par analyse sur gel BN-PAGE. Dans certaines conditions d'analyse sur BN-PAGE, les 2 sous-unités se dissocient et le sous-complexe F0 est détecté à 300 kDa. La figure 43A montre que la protéine AtpB-SPA a été détectée aux alentours de 300 kDa et aux alentours de 550 kDa ce qui valide notre système BN-PAGE.

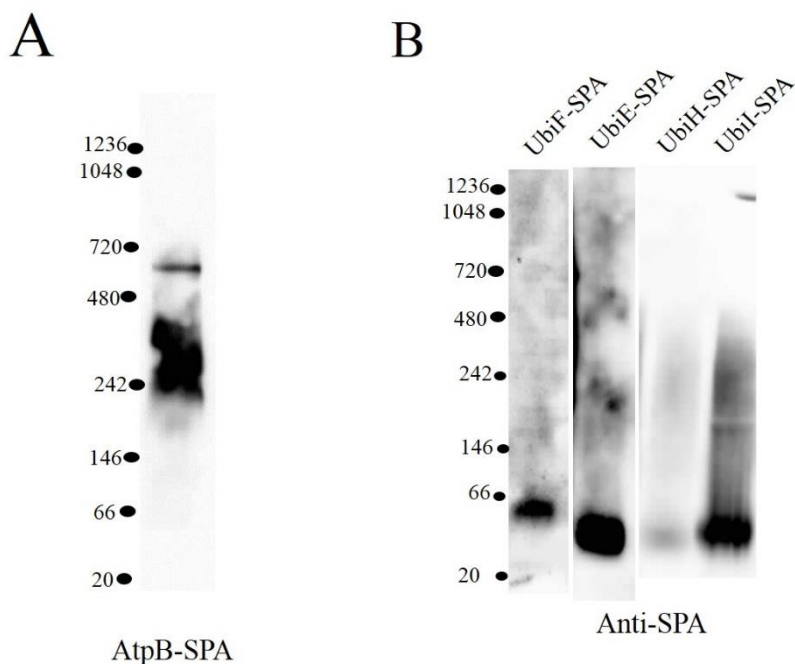


Figure 43 : Western blot du gel BN-PAGE : (A) La fraction membranaire de la souche AtpB-SPA de concentration 10 mg/mL a été solubilisée avec 2% DDM, puis 10 μ L sont analysés par migration sur gel BN-

PAGE. **(B)** Les membranes des souches UbiF-SPA, UbiE-SPA, UbiH-SPA et UbiI-SPA de concentration équivalente (8-10 mg/mL) ont été solubilisées avec 1% DDM pour UbiE-SPA et 2% DDM +100 mM NaCl pour Ubi-(H, I, F)-SPA. 10 µL de chaque échantillon sont analysés par migration sur gel BN-PAGE. Les protéines ont été détectées avec un anticorps anti-flag (n=2).

Une petite fraction des protéines UbiE-SPA, UbiF-SPA, UbiH-SPA et UbiI-SPA est détectée dans la fraction membranaire (figure 41). Les fractions membranaires solubilisées de ces souches ont été analysées sur gel BN-PAGE (figure 43B). UbiE, UbiH, UbiI et UbiF ont été détectées uniquement à leur taille théorique (figure 43B) suggérant que ces protéines ne sont pas associées à un complexe membranaire.

L'analyse de la fraction membranaire de la souche UbiK-SPA solubilisée par 1% DDM montre que la protéine est distribuée entre 200 et 480 kDa (figure 44A, piste 2). Ce résultat a été validé par une électrophorèse en deuxième dimension sur gel SDS-PAGE où la protéine UbiK-SPA (26 kDa) est détectée à sa taille théorique dans une zone correspondant à une taille de 200-480 kDa en 1^{ère} dimension (figure 44B, gel 1). UbiK-SPA a été aussi détectée aux alentours de 40 kDa en 2^{ème} dimension (figure 44B, gel 1). Il est envisageable que l'absence de détection de signaux à des tailles correspondantes en BN-PAGE (1D) puisse refléter une accessibilité diminuée du tag SPA dans la forme repliée de la protéine UbiK alors qu'en électrophorèse en conditions dénaturantes (2^{ème} dimension), le tag SPA est accessible

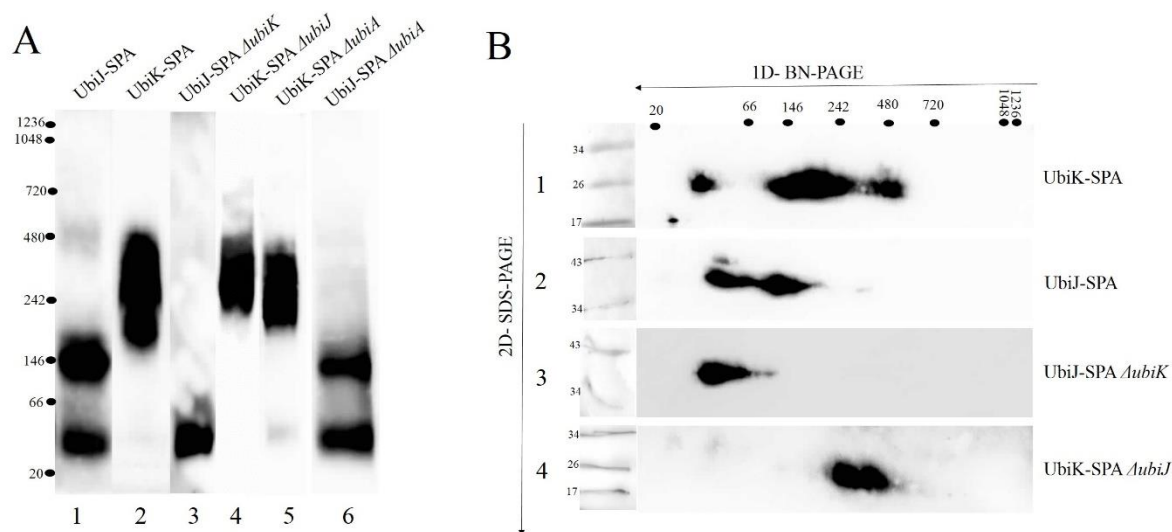


Figure 44 : **(A) Western blot du gel BN-PAGE :** Les membranes des souches UbiJ-SPA, UbiK-SPA, UbiJ-SPA ΔubiK de concentration équivalente (8-10 mg/mL) et UbiK-SPA ΔubiJ (5 mg/mL) ont été solubilisées avec 1% DDM. 10 µL de chaque échantillon sont analysés par migration sur gel BN-PAGE. Les protéines ont été détectées avec un anticorps anti-flag. **(B) Western blot du gel SDS-PAGE :** Electrophorèse SDS-PAGE en deuxième dimension de pistes du gel BN-PAGE suivie d'un western blot avec un anticorps anti-flag. Résultat représentatif de 5 préparations membranaires différentes.

L'analyse de la fraction membranaire d'une souche UbiJ-SPA solubilisée par 1% DDM montre que la protéine est détectée aux alentours de 150 kDa et également à sa taille monomérique de 40 kDa (figure 44A, piste 1). Ce résultat a été validé par une électrophorèse en deuxième dimension sur gel SDS-PAGE où la protéine UbiJ-SPA (40 kDa) est détectée dans une zone correspondante à une taille de 40-150 kDa en 1^{ère} dimension (figure 44B, gel 2). Les protéines UbiJ et UbiK sont détectées à une taille supérieure à celle de leur forme monomérique ce qui pourrait refléter soit une oligomérisation des protéines, soit une interaction avec d'autres protéines.

UbiA est une protéine intégrale membranaire avec 9 hélices transmembranaires (**Huang *et al.* 2014**). Afin de vérifier si UbiK et UbiJ sont en interaction avec UbiA, Laurent Loiseau a construit les souches UbiK-SPA $\Delta ubiA$ et UbiJ-SPA $\Delta ubiA$. Nos résultats d'analyse sur BN-PAGE des fractions membranaires solubilisées de ces souches montrent que la délétion de *ubiA* n'affecte pas la distribution des protéines UbiJ-SPA et UbiK-SPA (figure 44A, pistes 5 et 6), suggérant qu'UbiA n'interagit pas avec ces protéines dans nos conditions d'analyse.

4-c- Etude de l'interaction entre UbiJ et UbiK :

Afin de vérifier l'effet de la délétion d'une protéine sur l'autre, Laurent Loiseau nous a construit les souches UbiJ-SPA $\Delta ubiK$ et UbiK-SPA $\Delta ubiJ$. J'ai vérifié sur gel SDS-PAGE que le signal d'UbiK-SPA dans la fraction membranaire n'est pas affecté par la délétion d'*ubiJ* (figure 45A). De même, le signal d'UbiJ-SPA est équivalent dans les deux fractions membranaire et soluble dans les deux souches UbiJ-SPA et UbiJ-SPA $\Delta ubiK$ (figure 45B). En ce qui concerne la protéine UbiK, le signal détecté sur gel SDS est moins intense dans la souche $\Delta ubiJ$ ce qui peut refléter une solubilisation moins efficace de la protéine UbiK-SPA en absence d'*ubiJ* (figure 45C). La délétion d'*ubiK* n'a pas d'effet sur la solubilisation d'UbiJ puisqu'une quantité équivalente de la protéine UbiJ-SPA est détectée dans les fractions membranaires solubilisées des souches UbiJ-SPA et UbiJ-SPA $\Delta ubiK$ (figure 45D).

La mutation d'*ubiK* dans la souche UbiJ-SPA entraîne la disparition du signal de 150 kDa et la détection d'un signal aux alentours de 40 kDa (taille théorique d'UbiJ-SPA) (figure 44A, piste 3). De même, la mutation d'*ubiJ* dans la souche UbiK-SPA entraîne la disparition du signal aux alentours de 200 kDa (figure 44A, piste 4). Ces résultats sont validés en 2^{ème}

dimension puisque la protéine UbiJ-SPA est détectée à sa taille théorique dans une zone correspondant à une taille de 40 kDa en 1^{ère} dimension et la protéine UbiK-SPA est détectée à sa taille théorique (26 kDa) dans une zone localisée entre 242 et 480 kDa (figure 44B, gels 3 et 4 respectivement).

L'ensemble de ces résultats établit que les protéines UbiJ et UbiK forment un complexe associé à la membrane. Le fait que la mutation d'*ubiJ* entraîne la disparition du signal détecté pour UbiK aux alentours de 200 kDa mais la persistance du signal aux alentours de 242-480 kDa pourrait suggérer qu'UbiK appartient à plusieurs complexes associés à la membrane.

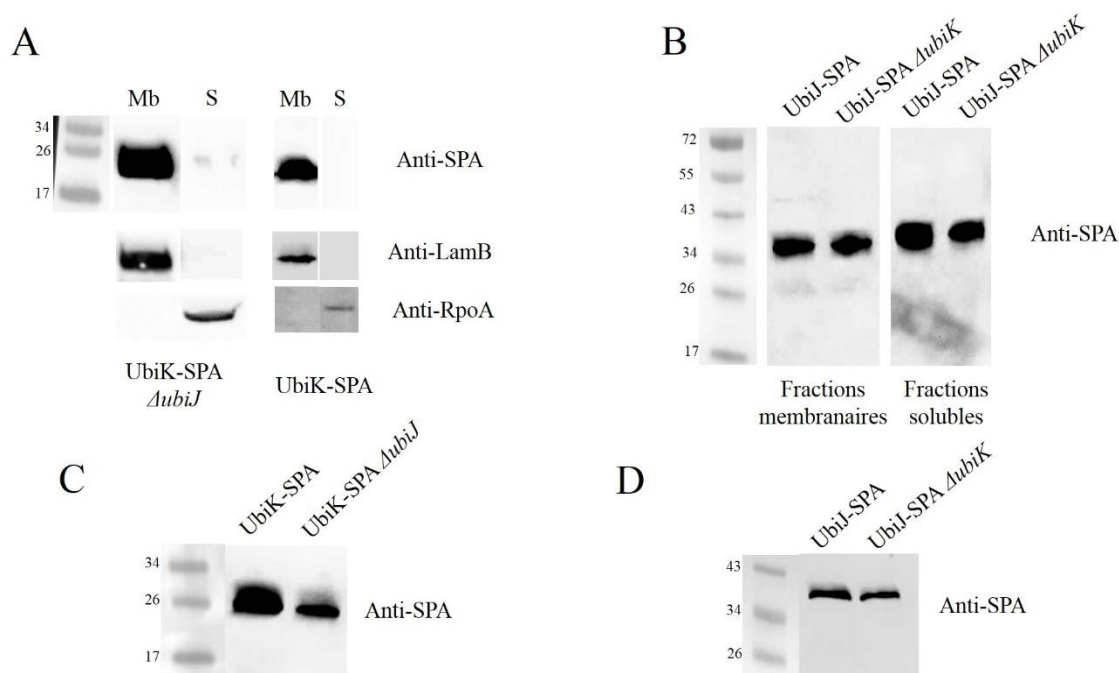


Figure 45 : Western blot du gel SDS-PAGE : (A) Western blot de la protéine UbiK-SPA à partir des fractions membranaires et solubles. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales. Le fractionnement a été vérifié par utilisation de 2 contrôles LamB (protéine membranaire) et RpoA (protéine soluble). La détection de ces 2 protéines se fait sur la même membrane que celle utilisée pour la détection avec un anticorps anti-flag suite au stripping et à l'incubation avec des anticorps polyclonaux correspondants. (B) Western blot de la protéine UbiJ-SPA à partir des fractions membranaires et solubles. Dépôt sur gel SDS-PAGE de 20 µg de protéines totales. (C) et (D) 10 µL de fractions membranaires solubilisées (1% DDM) ont été déposés sur gel SDS. Dans toutes les figures, la détection des protéines UbiK-SPA et UbiJ-SPA se fait grâce à l'anticorps anti-flag.

Nos collaborateurs au laboratoire de chimie bactérienne à Marseille ont montré grâce à des expériences de double hybride de levure qu'UbiK interagit avec les 50 acides aminés terminaux d'UbiJ (données non publiées). De plus, nos collaborateurs au Collège de France ont aussi montré par des expériences de chromatographie de filtration sur gel que les protéines purifiées UbiK et UbiJ sont en interaction. L'ensemble de nos résultats et les observations de nos

collaborateurs confirment la présence d'un complexe protéique associé à la membrane regroupant les protéines UbiK et UbiJ.

5- Analyse des protéines Ubi solubles :

5-a- Analyse de fractions solubles sur gel BN-PAGE :

Les fractions solubles des souches UbiF-SPA, UbiH-SPA, UbiI-SPA et UbiJ-SPA cultivées en aérobiose ont été également analysées sur gel BN-PAGE (figure 46).

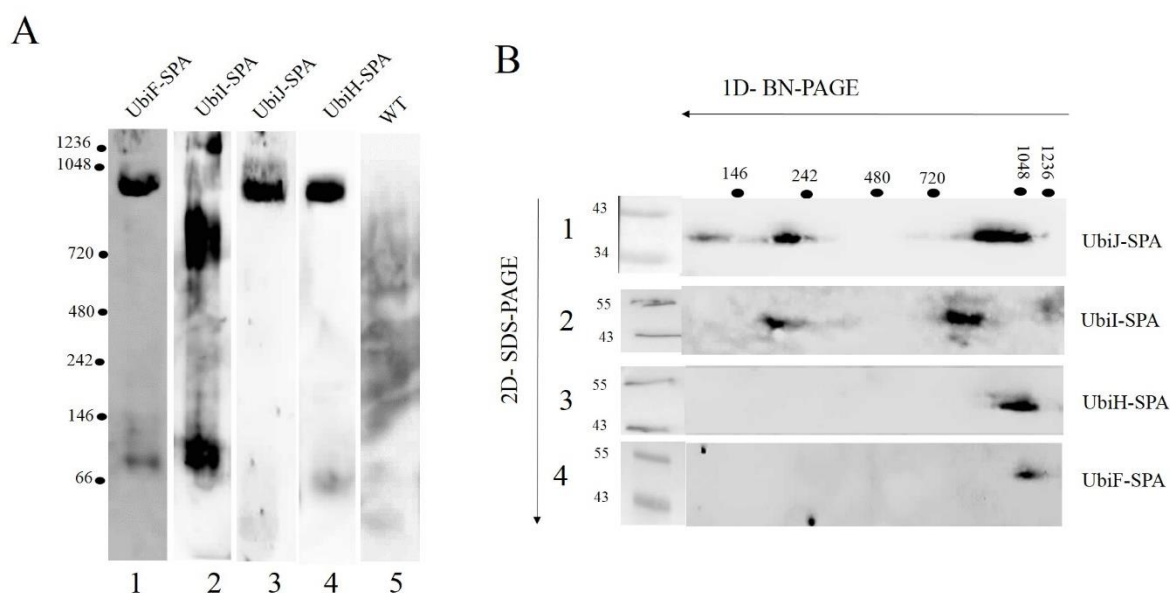


Figure 46 : (A) Western blot du gel BN-PAGE : 10 μ L de surnageant des souches UbiJ-SPA, UbiI-SPA, UbiF-SPA et UbiH-SPA de concentration équivalente (6 mg/mL) sont analysés par migration sur gel BN-PAGE. Les protéines ont été détectées avec un anticorps anti-flag. (B) Western blot du gel SDS-PAGE : Electrophorèse SDS-PAGE en deuxième dimension de pistes du gel BN-PAGE suivie d'un western blot avec un anticorps anti-flag.

Les protéines UbiF-SPA, UbiH-SPA et UbiJ-SPA sont détectées aux alentours de 1 MDa (figure 46A, pistes 1,3 et 4 respectivement) tandis que la protéine UbiI-SPA est détectée aux alentours de 800 kDa et de 100 kDa (figure 46A, piste 2). Tous ces résultats ont été validés par une électrophorèse en deuxième dimension sur gel SDS-PAGE où les protéines UbiF-SPA (51 kDa), UbiH-SPA (50 kDa) et UbiJ-SPA (40 kDa) d'une part et la protéine UbiI (52 kDa) d'autre part sont détectées à leurs tailles théoriques dans une zone correspondante à une taille de 1 MDa

(pour UbiH, UbiF et UbiJ ; gels 1, 3 et 4 respectivement, figure 46B) et 800 kDa (pour UbiI) en 1^{ère} dimension (figure 46B, gel 2). Ces résultats suggèrent que ces protéines sont associées à un complexe de taille comprise entre 800 et 1000 kDa.

5-b- analyse protéomique des fragments du gel BN-PAGE

Suite aux résultats ci-dessus et afin de valider la présence de ces protéines Ubi au sein d'un complexe de taille environ 1000 kDa, nous avons collaboré avec Yohann Couté et Sabine Brugière (laboratoire EdyP à Grenoble) pour l'analyse protéomique de fragments de gel BN-PAGE. Ainsi, j'ai fourni un fragment du gel BN-PAGE correspondant à une taille de complexe protéique entre 900 et 1000 kDa (figure 47) d'une piste dans laquelle la fraction soluble de la souche UbiH-SPA a été séparée.

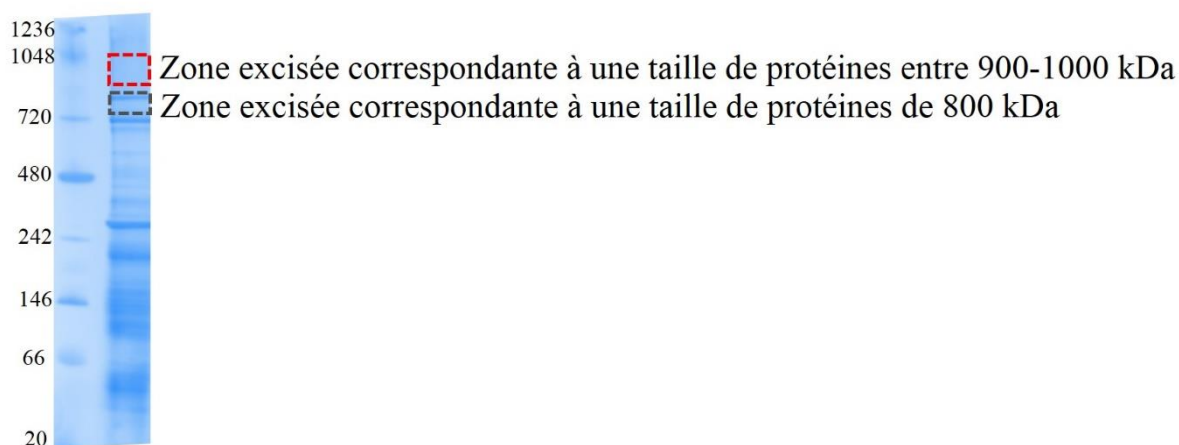


Figure 47 : Photo du gel BN-PAGE montrant les différentes zones du gel excisées pour l'analyse protéomique.

5-b-i- analyse protéomique du fragment du gel BN-PAGE excisé de la souche UbiH-SPA correspondant à une taille de protéines de 1000 kDa

Cette analyse protéomique a permis de détecter beaucoup de protéines (424 protéines). Plusieurs protéines détectées dans ce fragment de gel BN-PAGE ont été décrites pour former des complexes de haute masse moléculaire dans plusieurs études protéomiques (**Lasserre *et al.* 2006; Pan *et al.* 2011**) (tableau 7). Dans ces études, l'analyse se fait par BN-PAGE / 2D-SDS suivie par analyse des fragments de membrane excisés par spectrométrie de masse. Les protéines qui appartiennent au même complexe protéique co-migrent en 1^{ère}

dimension et leurs signaux correspondants sont alignés en seconde dimension sur gel SDS-PAGE.

taille du complexe (kDa)	Gène	peptides détectés*	fonction de la protéine	masse monomérique	références
650	rpoC	70	RpoC fait partie de la famille des ARN polymérases	155,1	Pan <i>et al.</i> 2011
	groL	17	Protéine Chaperone	57,3	
	rpsA	13	RpsA fait partie de la sous-unité 30S du ribosome	61,1	
	lpdA	23	composant du pyruvate déshydrogénase et de 2-oxoglutarate déshydrogénase	50,7	
650	rpoA	9	sous-unité A de l'ARN polymérase	36,5	Lasserre <i>et al.</i> 2006
	rpoB	48	sous-unité B de l'ARN polymérase	150,6	
	rpoC	70	sous-unité C de l'ARN polymérase	155,1	
	rpoD	8	sous-unité D de l'ARN polymérase	70,4	
600	dnaK	4	Protéine chaperone	68,9	Lasserre <i>et al.</i> 2006
	gyrA	16	Sous-unité A de l'ADN gyrase essentielle pour la réplication du chromosome bactérien	96,9	
	rpsA	13	RpsA fait partie de la sous-unité 30S du ribosome	61,1	
600	malP	37	Maltodextrine phosphorylase	90,3	Pan <i>et al.</i> 2011
800	GroL	17	Protéine Chaperone	57,3	Lasserre <i>et al.</i> 2006
> 1000	lpdA	23	composant du pyruvate déshydrogénase et de 2-oxoglutarate déshydrogénase	50,7	Lasserre <i>et al.</i> 2006
	aceF	32	dihydrolipoyllysine acétyltransférase: composant du complexe pyruvate déshydrogénase	65,9	
	aceE	55	composant I du complexe pyruvate déshydrogénase	99,9	

Tableau 7: Le tableau montre les différentes protéines décrites dans la littérature pour être associé en un complexe de haut poids moléculaire dont la taille (observée en BN-PAGE) est marquée dans la colonne 1. Le nombre de peptides spécifiques détectés pour chaque protéine est indiqué dans la colonne 3. * Nombre de peptides détectés dans notre étude.

Les complexes multimériques RpoC-RpsA-GroL-LpdA et DnaK-GyrA-RpsA ont été détectés à 650 kDa et 600 kDa respectivement (Pan *et al.* 2011; Lasserre *et al.* 2006). Le complexe pyruvate déshydrogénase est formé de 3 sous-unités LpdA, AceE et AceF, dont les deux sous-unités LpdA et AceF ont été identifiés par Lasserre *et al.* (Lasserre *et al.* 2006). Le complexe d'ARN polymérase contient 4 protéines RpoA-RpoB-RpoC-RpoD. Lasserre *et al.* ont détecté ces protéines à une taille d'environ 650 kDa (Lasserre *et al.* 2006). Des protéines comme MalP et GroL peuvent former des complexes homomultimériques. GroL a été détectée sous forme d'un complexe multimérique de 14 sous-unités (Lasserre *et al.* 2006) et MalP a été détectée dans un complexe multimérique de 16 sous-unités (Pan *et al.* 2011). Toutes ces protéines ont été détectées dans le fragment de gel de la souche UbiH-SPA de taille 1000 kDa que nous avons analysé (voir tableau 8) et sont désignés par le terme de « protéines contrôles » dans la suite de ce manuscrit. En plus, 15 protéines de la petite sous-unité ribosomale (30s) (masse théorique 900 kDa) et 20 protéines de la grande sous-unité ribosomale (50s) (masse théorique 1300 kDa) ont été détectées dans ce fragment de gel.

		UbiH-SPA 1000 kDa	
Protéine	Code swissprot	iBAQ (%)	rang d'abondance
PTKC	P69831	76,61	1
ODO2	P0AFG6	65,61	2
LPP	P69776	31,74	3
GADC	P63235	28,08	4
CYDA	P0ABJ9	26,37	5
PTTBC	P36672	25,27	6
PTNC	P69801	23,71	7
OSME	P0ADB1	19,52	8
OMPA	P0A910	18,58	9
RECA	P0A7G6	15,03	10
YAJC	P0ADZ7	14,99	11
RL20	P0A7L3	13,48	12
ATPF	P0ABA0	12,71	13
ACEE	P0AFG8	11,58	14
METQ	P28635	11,31	15
CYDB	P0ABK2	11,18	16
SLP	P37194	10,89	17
DCUA	P0ABN5	10,88	18
RS10	P0A7R5	10,57	19
ACEF	P06959	10,35	20
UbiE	P0A887	9,63	21
SLYB	P0A905	9,53	22
GATZ	P0C8K0	9,51	23
GATY	P0C8J6	8,63	24
RHO	P0AG30	8,36	25
LPDA	P0A9P0	6,53	27
RPSA	P0AG67	3,90	54
MALP	P00490	3,61	59
RPOC	P0A8T7	3,31	61
RPOB	P0A8V2	2,39	88
GYRA	P0AE54	0,61	191
GROL	C5A1D5	0,58	197
RPOA	P0A7Z4	0,20	299
RPOD	P00579	0,12	344
DNAK	P0A6Y0	0,03	434
UbiK	Q46868	2,35	90
UbiF	P75728	1,72	116
UbiI	P25535	1,06	155
UbiH	P25534	0,81	169
UbiJ	P0ADP7	0,47	215
UbiG	P17993	0,26	271

Tableau 8 : Tableau présentant i) les 25 protéines les plus abondantes dans le fragment de gel de 1000 kDa, ii) les protéines contrôles indiquées en gris et iii) les protéines Ubi indiquées en bleu. Leur rang d'abondance ainsi que leur iBAQ (Intensity Based Label Free Absolute Quantification) sont également indiqués. Les valeurs des iBAQ indiqués sont normalisées par rapport à l'iBAQ total de toutes les protéines détectées dans le fragment. Ainsi, la somme des iBAQ normalisés est égale à 1.

L'abondance des protéines dans le fragment de gel BN-PAGE analysé est basée sur les valeurs iBAQ (Intensity Based Label Free Absolute Quantification) normalisées. iBAQ est égal à la somme des intensités des peptides de chaque protéine enregistrée par MaxQuant divisée par le nombre de peptides théorique de chaque protéine. Dans nos conditions d'analyse, PTKC est la protéine la plus abondante dans ce fragment de gel (iBAQ le plus élevé, tableau 8) et représente 7,6% des protéines dans notre échantillon. Alors que les études protéomiques effectués sur des fractions solubles n'ont pas permis de détecter des protéines Ubi (**Lasserre *et al.* 2006; Pan *et al.* 2011**), nous avons détecté sept protéines Ubi dans notre analyse. Ces protéines sont UbiE, UbiF, UbiG, UbiH, UbiI, UbiJ, UbiK. UbiE fait partie des protéines les plus abondantes dans ce fragment de gel.

De façon étonnante, UbiK a été détectée dans ce fragment 1000 kDa du gel BN-PAGE alors que dans les conditions d'analyse utilisées, nous détectons UbiK-SPA uniquement dans la fraction membranaire par western-blot (figure 36). Ainsi, il est probable qu'une fraction mineure de la protéine UbiK-SPA (non détectable par western-blot) soit tout de même présente dans la fraction soluble réalisée avec le tampon 1. De plus, nos résultats montrent qu'une partie de la protéine UbiK-SPA est soluble dans le tampon 4 (figure 35) ; il serait donc intéressant d'évaluer sur BN-PAGE la distribution d'UbiK-SPA dans la fraction soluble issue de la lyse dans le tampon 4. Alternativement, des protéines membranaires sont détectées dans la fraction soluble analysée par protéomique suggérant une contamination de la fraction soluble par la fraction membranaire. Ainsi, UbiK détectée dans la fraction soluble pourrait correspondre à celle détectée dans la fraction membranaire.

5-b-ii- analyse protéomique des fragments du gel BN-PAGE excisés des souches UbiH-SPA et UbiI-SPA correspondant à une taille de protéines de 800 kDa

UbiI a été détectée par analyse protéomique du fragment du gel correspondant à 1000 kDa (tableau 8) alors qu'en western blot la protéine UbiI-SPA est détectée aux alentours de 800 kDa (figure 46A, piste 2). Cette différence pourrait être liée au tag SPA présent sur UbiI qui pourrait entraîner la dissociation de certaines protéines du complexe, causant ainsi sa migration à une

taille aux alentours de 800 kDa. Comme UbiI n'est pas étiquetée dans une souche UbiH-SPA, le complexe ne serait pas perturbé et UbiI migrerait alors à 900-1000 kDa comme la plupart des protéines Ubi. Pour vérifier cette hypothèse, des fragments du gel autour de 800 kDa d'extraits des souches UbiI-SPA (échantillon 4) et UbiH-SPA (échantillon 1) ont été analysé par protéomique (tableau 9).

Protéine	code d'entrée swiss prot	UbiH-SPA 800 kDa	UbiH-SPA 1000 kDa	UbiI-SPA 800 kDa	rapport 2/1	rapport 4/1	rang 1	rang 2
		iBAQ 1 (‰)	iBAQ 2 (‰)	iBAQ 4 (‰)				
ACEE	P0AFG8	127,95	11,58	143,12	0,09	1,12	1	14
ACEF	P06959	107,86	10,35	125,52	0,10	1,16	2	20
LPDA	P0A9P0	61,68	6,53	60,77	0,11	0,99	3	27
ADHE	P0A8T7	31,13	6,33	44,54	0,20	1,43	4	31
RPOC	P0A8T7	20,51	3,31	18,19	0,16	0,89	5	61
LPP	P69776	17,95	31,74	25,70	1,77	1,43	6	3
COPA	Q59385	15,17	0,61	0,09	0,04	0,01	7	190
RPOB	P0A8V2	14,10	2,39	14,64	0,17	1,04	8	88
RBSB	P02925	14,06	0,47	11,30	0,03	0,80	9	216
OMPA	P0A910	13,91	18,58	14,78	1,34	1,06	10	9
RPSA	P0AG67	13,64	3,90	17,53	0,29	1,28	11	54
RPOA	P0A7Z4	12,03	0,20	10,95	0,02	0,91	12	299
GROL	C5A1D5	11,01	0,58	17,82	0,05	1,62	13	197
MALP	P00490	5,87	3,61	5,32	0,61	0,91	21	59
RPOD	P00579	4,06	0,12	3,42	0,03	0,84	30	344
GYRA	P0AE54	1,08	0,61	1,11	0,56	1,03	82	191
DNAK	P0A6Y0	0,04	0,03	0,14	0,62	3,25	264	434
PTKC	P69831	9,82	76,61	3,06	7,80	0,31	14	1
ODO2	P0AFG6	0,07	65,61	-	994,33	-	237	2
GADC	P63235	3,28	28,08	21,05	8,57	6,42	34	4
CYDA	P0ABJ9	1,96	26,37	4,72	13,45	2,41	54	5
PTTBC	P36672	2,19	25,27	0,80	11,53	0,37	49	6
PTNC	P69801	1,92	23,71	3,42	12,37	1,78	58	7
OSME	P0ADB1	4,21	19,52	17,72	4,63	4,21	28	8
RECA	P0A7G6	6,72	15,03	8,00	2,24	1,19	18	10
UbiE	P0A887	0,31	9,63	6,88	30,64	21,88	144	21
UbiF	P75728	0,20	1,72	2,03	8,43	9,94	172	116
UbiI	P25535	0,01	1,06	1,89	82,09	147,22	310	155
UbiK	Q46868	-	2,35	1,05	-	-	-	90
UbiH	P25534	-	0,81	0,14	-	-	-	169
UbiJ	P0ADP7	-	0,47	1,23	-	-	-	215
UbiG	P17993	-	0,26	0,16	-	-	-	271

Tableau 9 : Tableau présentant i) les 13 protéines les plus abondantes dans le fragment de gel de 800 kDa (UbiH-SPA 800 kDa, échantillon 1), ii) les protéines contrôles indiquées en gris, iii) les protéines Ubi indiquées en bleu et iv) les 10 protéines les plus abondantes dans le fragment UbiH-SPA 1000 kDa (tableau 8) indiquées en orange. Les valeurs des iBAQ dans les échantillons 1 (UbiH-SPA 800 kDa), 2 (UbiH-SPA 1000 kDa) et 4 (UbiI-SPA 800 kDa) sont indiqués. Rapport 2/1 et 4/1 signifie le rapport effectué entre les iBAQ de l'échantillon 4 et les iBAQ de l'échantillon 1 ainsi que les iBAQ de l'échantillon 4 et les iBAQ de l'échantillon 1, respectivement.

5-b-ii-1- Les protéines Ubi migrent à 1000 kDa

Nous pouvons tout d'abord remarquer que les protéines contrôles sont beaucoup plus abondantes dans l'échantillon 1 que dans l'échantillon 2 et que plusieurs d'entre elles sont en fait parmi les protéines les plus abondantes de l'échantillon 1 (colonne « rang 1 », tableau 9). Ces observations sont en accord avec les données de la littérature qui montrent que la majorité de ces protéines est détectée à une taille de 650-800 kDa (tableau 7). En revanche, les iBAQ des protéines les plus abondantes dans le fragment 2 (UbiH-SPA 1000 kDa) diminuent fortement dans le fragment 1 (UbiH-SPA 800 kDa). Concernant les protéines Ubi, les protéines UbiH, UbiK, UbiJ et UbiG sont détectées uniquement dans l'échantillon 2 (comparez iBAQ 2 et iBAQ 1 dans le tableau 9). En revanche, les protéines UbiE, UbiF et UbiI sont détectées dans les deux fragments, mais elles sont beaucoup plus abondantes dans l'échantillon 2 (voir rapport iBAQ2/iBAQ1). Ces résultats montrent que les protéines Ubi sont localisées aux alentours de 1000 kDa plutôt que 800 kDa dans les extraits de la souche UbiH-SPA en accord avec les résultats de WB (figure 46).

5-b-ii-2- Le tag SPA sur UbiI perturbe la migration du complexe sur BN-PAGE

En comparant les échantillons 1 et 4, nous avons trouvé que les protéines UbiH, UbiK, UbiJ et UbiG sont détectées uniquement dans l'échantillon 4 (comparez iBAQ1 et iBAQ4, tableau 9). Les protéines UbiE, UbiF et UbiI sont détectées dans les deux fragments de gel mais le signal est beaucoup plus important dans l'échantillon 4 (voir rapport iBAQ4/iBAQ1 dans le tableau 9). En revanche, les protéines Ubi sont toutes détectées dans les fragments 2 et 4 avec des iBAQ similaires dans les deux échantillons (sauf pour UbiK et UbiH). Pour les protéines contrôles, les iBAQ sont presque similaires dans les échantillons 1 et 4. L'ensemble de ces résultats établit que la migration des protéines Ubi est spécifiquement affectée dans l'extrait de la souche UbiI-SPA. Ces protéines Ubi sont alors localisées dans une zone du gel BN-PAGE autour de 800 kDa alors qu'elles se situent à 1000 kDa dans l'extrait de la souche UbiH-SPA. Ce résultat suggère que la présence du tag SPA sur la protéine UbiI entraîne probablement la dissociation d'une ou plusieurs protéines et cause la migration du complexe à 800 kDa.

En conclusion, les analyses protéomiques sont en accord avec nos résultats obtenus par Western Blot. Les protéines UbiI, UbiH, UbiF et UbiJ sont détectés dans un complexe protéique de haut

poids moléculaire (1000 kDa). Cette analyse protéomique établit aussi la présence des protéines UbiE, UbiG et UbiK dans ce complexe protéique. Ce complexe protéique est désigné par le terme « **complexe Ubi** » dans la suite de ce manuscrit. Des analyses sur BN-PAGE des fractions solubles des souches UbiE-SPA, UbiG-SPA et UbiK-SPA sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

5-c- Effet des mutations d'UbiJ et d'UbiK sur la distribution des protéines solubles :

Nos résultats indiquent que la protéine UbiJ est localisée dans un complexe membranaire (avec UbiK) et dans un complexe soluble (avec UbiH, UbiF, UbiI, UbiE, UbiG et UbiK). Nous avons donc voulu connaître l'effet de la délétion d'*ubiJ* sur la distribution des protéines au niveau du complexe soluble. De même, nous avons testé l'impact de la délétion d'*ubiK*. A cette fin, Laurent Loiseau nous a construit les souches UbiF-SPA $\Delta ubiJ$, UbiH-SPA $\Delta ubiJ$, UbiI-SPA $\Delta ubiJ$, UbiI-SPA $\Delta ubiK$, UbiF-SPA $\Delta ubiK$ et UbiH-SPA $\Delta ubiK$. Dans ces souches, nous avons i) vérifié le contenu en coenzyme Q₈, ii) évalué la répartition des protéines UbiH, UbiI et UbiF entre fraction membranaire et fraction soluble, iii) analysé le signal détecté pour ces protéines en BN-PAGE, iv) réalisé une analyse protéomique sur quelques échantillons.

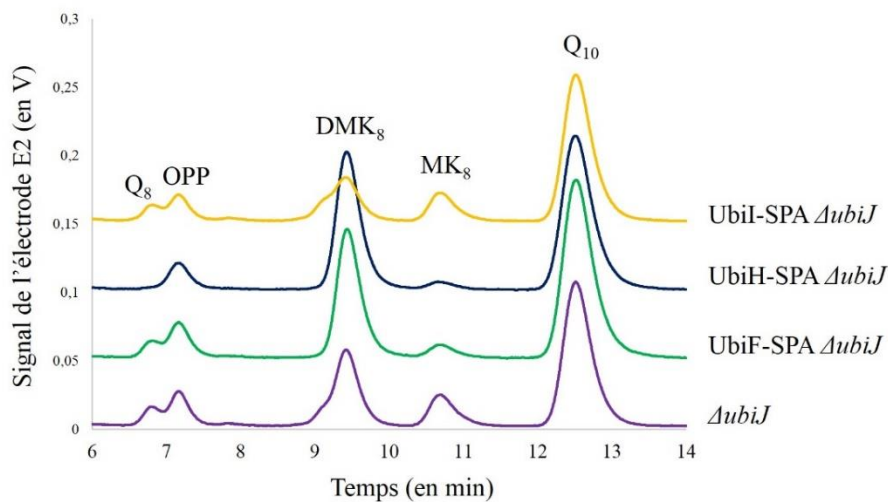
5-c-i- Analyse du taux de Q₈ produit dans les souches –SPA inactivées pour *ubiJ* ou *ubiK* :

Un aliquot de culture de chaque souche est prélevé et le contenu de quinones est analysé par HPLC-ECD (figure 48). Les 3 souches UbiF-SPA $\Delta ubiJ$, UbiH-SPA $\Delta ubiJ$, UbiI-SPA $\Delta ubiJ$ biosynthétisent très peu de Q₈ (environ 1% du WT) et accumulent de l'OPP tout comme la souche $\Delta ubiJ$ (figure 48A). Les souches UbiI-SPA $\Delta ubiK$, UbiF-SPA $\Delta ubiK$ ont un contenu diminué en Q₈ et accumulent également de l'OPP de façon comparable à la souche $\Delta ubiK$ (figure 48B). Ces 5 souches montrent un phénotype conforme à celui attendu et sont donc utilisables pour des expériences ultérieures de mise en évidence du complexe protéique.

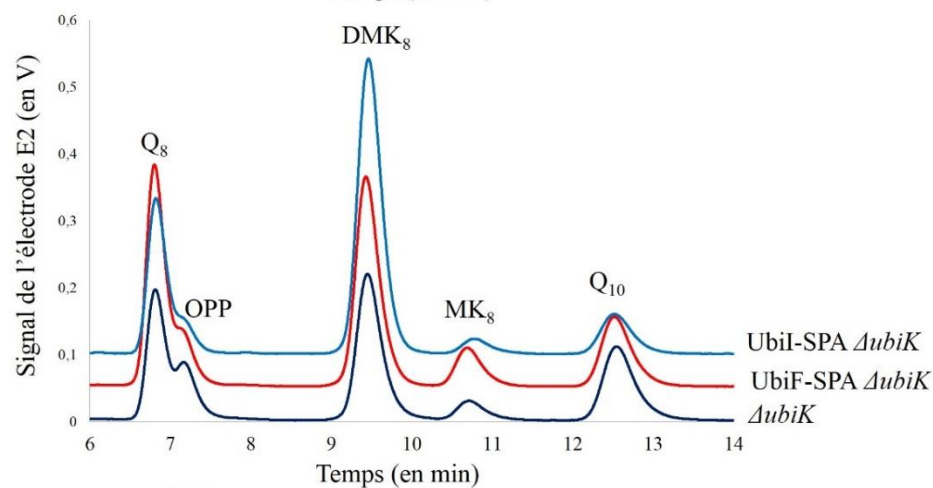
En revanche, la souche UbiH-SPA $\Delta ubiK$ accumule une quantité très importante d'OPP en comparant à la souche $\Delta ubiK$ mais ne biosynthétise que très peu de Q₈ (figure 48C). Les 2 clones fournis par Laurent Loiseau ont été vérifiés par PCR pour la délétion d'*ubiK* et ont montré le même contenu en quinones. Il se peut que la présence du tag SPA sur *ubiH* et

l'absence d'*ubiK* aient un effet additif négatif sur la biosynthèse de Q₈. La souche UbiH-SPA Δ *ubiK* ne sera donc pas utilisée pour des expériences ultérieures de caractérisation du complexe protéique.

A



B



C

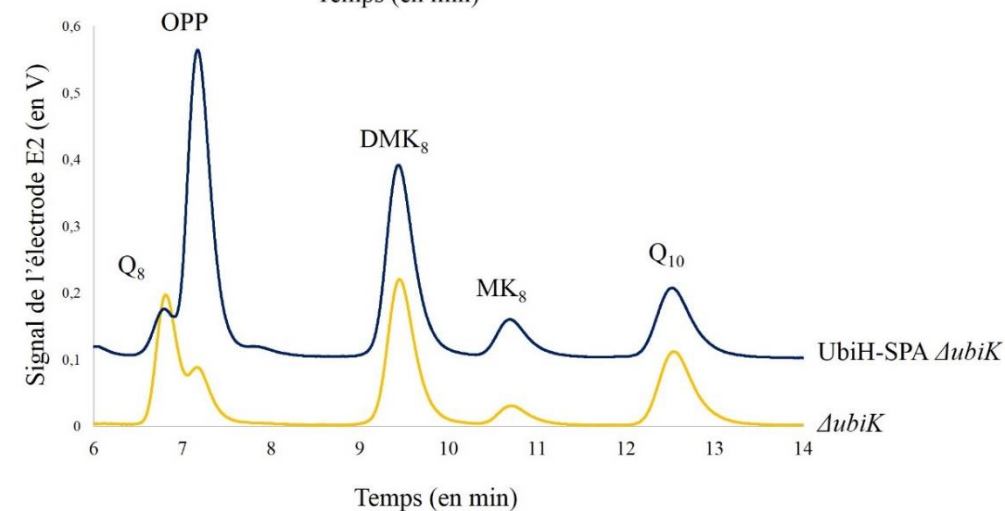


Figure 48 : Contenu en quinones des souches inactivées pour *ubiJ* ou *ubiK* : Les différentes souches sont cultivées dans du milieu LB. Un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1 mg de cellules est analysé en HPLC-ECD. Les pics correspondants à Q₈, OPP, DMK₈, MK₈ et au standard interne Q₁₀ sont indiqués sur les électrochromatogrammes.

5-c-ii- Répartition des protéines Ubi-SPA dans les souches inactivées pour *ubiJ* ou *ubiK* :

Afin de vérifier si la mutation d'*ubiJ* et d'*ubiK* affecte ou non l'abondance et la répartition des protéines UbiF-SPA, UbiI-SPA et UbiH-SPA entre la fraction membranaire et la fraction soluble, j'ai analysé l'abondance de ces protéines sur gel SDS-PAGE par immunodétection avec un anticorps anti-flag.

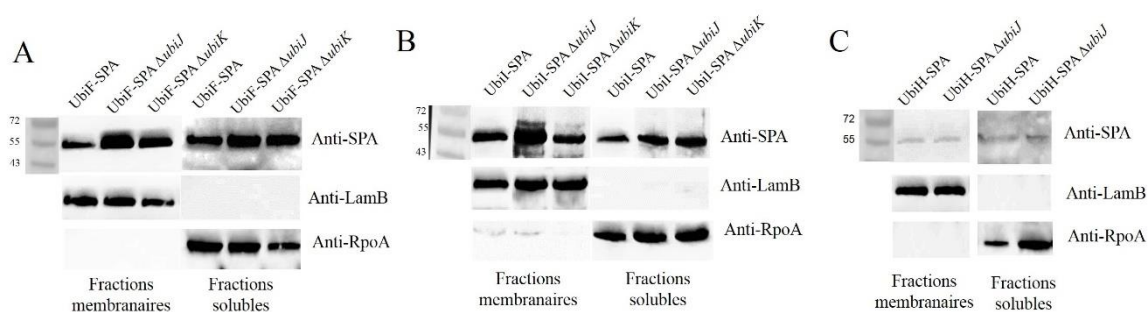


Figure 49 : Répartition équivalente des protéines UbiF-SPA, UbiH-SPA et UbiI-SPA dans les fonds génétiques WT, $\Delta ubiJ$ et $\Delta ubiK$: Western blot des protéines UbiF-SPA, UbiH-SPA et UbiI-SPA à partir des fractions membranaires et solubles des différentes souches. Dépôt de 20 μ g de protéines totales. Le fractionnement a été vérifié par utilisation de 2 contrôles LamB (protéine membranaire) et RpoA (protéine soluble). La détection de ces 2 protéines se fait sur la même membrane que celle utilisée pour la détection avec un anticorps anti-flag suite au stripping et à l'incubation avec les anticorps polyclonaux correspondants.

Dans un fond génétique sauvage, les protéines UbiF-SPA et UbiI-SPA sont réparties de façon équivalente entre les fractions membranaire et soluble (figure 49 A et B). Les délétions d'*ubiK* et d'*ubiJ* ne semblent pas affecter la distribution de ces protéines dans les deux fractions. Le signal détecté pour la protéine UbiH-SPA est très faible mais il semble que la mutation d'*ubiJ* n'a pas d'effet sur la répartition de la protéine UbiH-SPA (figure 49C).

5-d- Effet de la délétion d'*ubiK* sur la distribution de protéines solubles en BN-PAGE :

Les fractions solubles des souches UbiF-SPA $\Delta ubiK$, UbiI-SPA $\Delta ubiK$ et UbiJ-SPA $\Delta ubiK$ ont été analysées sur BN-PAGE (figure 50).

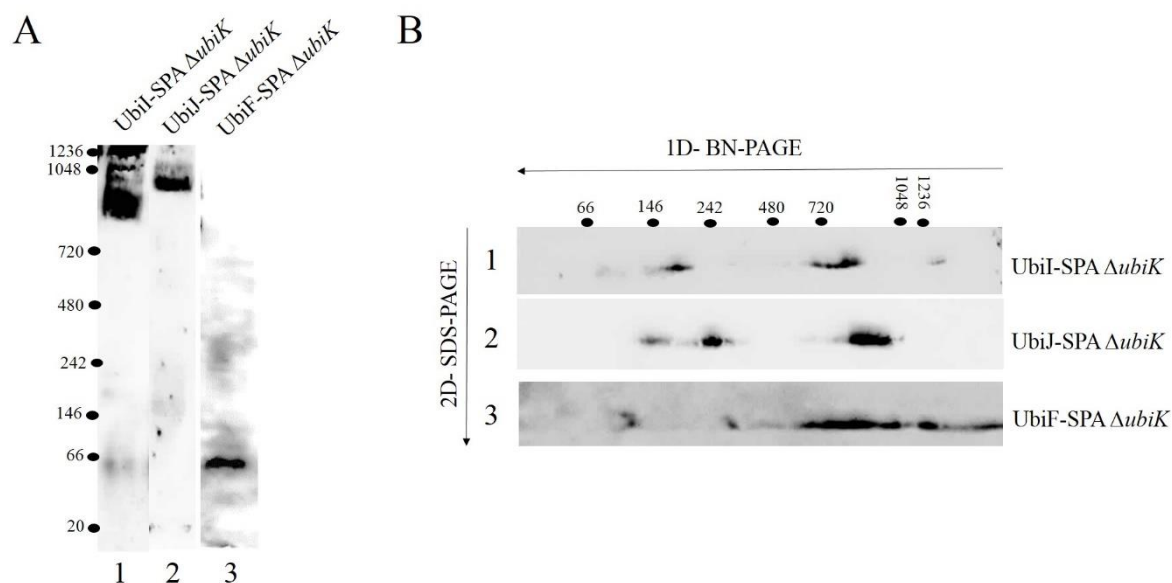


Figure 50 : (A) Western blot du gel BN-PAGE : 10 μ L de chaque surnageant des souches UbiI-SPA Δ ubiK, UbiJ-SPA Δ ubiK et UbiF-SPA Δ ubiK de concentration équivalente (5-6 mg/mL) sont analysés par migration sur gel BN-PAGE. Les protéines ont été détectées avec un anticorps anti-flag. (B) Western blot du gel SDS-PAGE : Electrophorèse SDS-PAGE en deuxième dimension du gel BN-PAGE des fractions solubles des différentes souches suivie d'un western blot avec un anticorps anti-flag.

La délétion d'*ubiK* n'affecte pas le signal de haut poids moléculaire des protéines UbiI-SPA et UbiJ-SPA (figure 50A, pistes 1 et 2) qui sont détectées aux alentours de 800 kDa et 1000 kDa respectivement dans les fonds génétiques sauvage (figure 46A) et Δ ubiK (figure 50A). Ces résultats ont été validés par une électrophorèse en deuxième dimension sur gel SDS-PAGE dans laquelle les protéines UbiI-SPA (52 kDa) et UbiJ-SPA (40 kDa) sont détectées dans une zone correspondant à une taille de 800 kDa et 1 MDa respectivement en 1^{ère} dimension (figure 50B, gels 1 et 2). En revanche, le signal aux alentours de 1 MDa de la protéine UbiF-SPA (figure 46A, piste 1) disparaît avec la mutation d'*ubiK* qui entraîne la détection de la protéine UbiF-SPA aux alentours de sa taille théorique (51 KDa) (figure 50A, piste 3). En 2D- SDS-PAGE, le signal de la protéine UbiF-SPA est dispersé dans une zone correspondant à une taille 480 kDa-1 MDa (figure 50B, gel 3). Il est envisageable que l'absence de détection de signaux à des tailles correspondantes en BN-PAGE (1D) puisse refléter une accessibilité diminuée du tag SPA dans la forme repliée de la protéine UbiF en absence d'*ubiK* alors qu'en électrophorèse en conditions dénaturantes (2^{ème} dimension), le tag SPA est accessible. Ces résultats indiquent que la protéine UbiK est importante pour la structuration de la protéine UbiF-SPA dans un complexe de haut poids moléculaire mais qu'elle n'influence pas l'association d'UbiI-SPA ni celle d'UbiJ-SPA dans ce complexe. Ce résultat est incompatible avec le dosage de quinones dans la souche UbiF-

SPA $\Delta ubiK$. En effet, cette souche biosynthétise une quantité limitée de Q₈ mais n'accumule pas de DMQ₈ (figure 48B) donc la délétion d'*ubiK* n'a pas d'effet spécifique sur l'association d'UbiF au complexe. Il est envisageable que le résultat observé en BN-PAGE pour la souche UbiF-SPA $\Delta ubiK$ soit un artefact de la présence du tag SPA qui pourrait entraîner, dans nos conditions d'analyse, la dissociation spécifique de la protéine UbiF-SPA du complexe en absence d'*ubiK*.

5-e- Effet de la délétion d'*ubiJ* sur la répartition des protéines solubles sur BN-PAGE:

Les fractions solubles des souches UbiF-SPA $\Delta ubiJ$, UbiH-SPA $\Delta ubiJ$ et UbiI-SPA $\Delta ubiJ$ ont été analysées sur BN-PAGE en parallèle avec les fractions solubles des souches UbiH-SPA, UbiI-SPA et UbiF-SPA (figure 51).

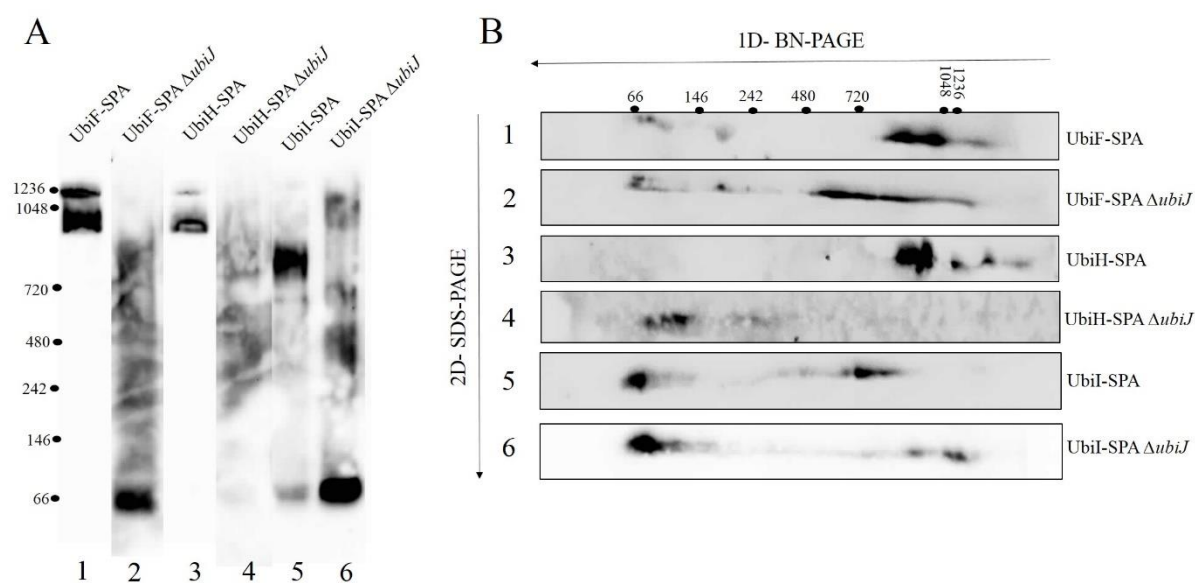


Figure 51: (A) Western blot du gel BN-PAGE : 10 μ L de chaque surnageant des souches UbiI-SPA, UbiF-SPA et UbiH-SPA de concentration équivalente (6 mg/mL) et des souches UbiH-SPA $\Delta ubiJ$, UbiI-SPA $\Delta ubiJ$ et UbiF-SPA $\Delta ubiJ$ de concentration équivalente (3-4 mg/mL) sont analysés par migration sur gel BN-PAGE. Les protéines ont été détectées avec un anticorps anti-flag. (B) Western blot du gel SDS-PAGE : Electrophorèse SDS-PAGE en deuxième dimension du gel BN-PAGE des fractions solubles des différentes souches suivie d'un western blot avec un anticorps anti-flag.

En 1D, la mutation d'*ubiJ* dans la souche UbiF-SPA entraîne la disparition du signal à 1 MDa et la détection de la protéine UbiF-SPA aux alentours de 50-60 kDa (taille théorique d'UbiF) (figure 51A, piste 2). De même, la mutation d'*ubiJ* dans la souche UbiI-SPA entraîne la

disparition du signal à 800 kDa et la détection de la protéine UbiI-SPA aux alentours de 50-60 kDa (taille théorique d'UbiI) (figure 51A, piste 6). Pour UbiH-SPA, la délétion d'*ubiJ* entraîne la disparition du signal à 1 MDa mais aucun signal n'est détecté aux alentours de la taille théorique d'UbiH-SPA (figure 51A, piste 4).

Le résultat de l'analyse 1D a été validé pour la protéine UbiI-SPA par une électrophorèse en deuxième dimension sur gel SDS-PAGE. En effet, la délétion d'*ubiJ* entraîne la disparition du signal de la protéine UbiI-SPA (52 kDa) de la zone à 800 kDa et sa détection dans une zone correspondant à une taille de 60 kDa en 1^{ère} dimension ainsi qu'à une taille supérieure à 1 MDa (figure 51B, comparez gels 6 et 5). Pour UbiH-SPA (50 kDa), la délétion d'*ubiJ* cause la disparition du signal autour de 900-1000 kDa et l'apparition d'un signal dans une zone correspondant à une taille 60-100 kDa en 1^{ère} dimension (figure 51B, comparez gels 3 et 4). Pour UbiF-SPA, la délétion d'*ubiJ* entraîne une dispersion du signal de la protéine dans une zone correspondant à une taille 480 kDa-1MDa (figure 51B, gel 2) comme ce qui a été observé dans la souche UbiF-SPA *ΔubiK* (figure 50B). L'ensemble des résultats obtenus démontrent néanmoins qu'UbiJ est cruciale pour la structuration des protéines UbiF, UbiH et UbiI dans le complexe Ubi.

5-f- analyse protéomique des fragments du gel excisés :

5-f-i- La délétion d'ubiJ affecte le niveau d'expression des protéines Ubi

Suite aux résultats ci-dessus et afin de valider que la délétion d'*ubiJ* déstabilise le complexe Ubi, des fragments du gel BN-PAGE de la souche UbiH-SPA *ΔubiJ* correspondant à une taille de protéines entre 900 et 1000 kDa (échantillon 3) et de la souche UbiI-SPA *ΔubiJ* (échantillon 5) correspondant à une taille de protéine de 800 kDa ont été analysés en protéomique (tableau 10).

	UbiH-SPA 1000 kDa	UbiH-SPA $\Delta ubiJ$ 1000 kDa		4 : UbiI-SPA 800 kDa 5 : UbiI-SPA $\Delta ubiJ$ 800 kDa
Protéine	iBAQ2(‰)	iBAQ3 (‰)	rapport 2/3	rapport 4/5
PTKC	76,61	74,89	1,02	0,59
ODO2	65,61	63,06	1,04	-
LPP	31,74	16,22	1,96	2,43
GADC	28,08	6,96	4,04	12,90
CYDA	26,37	12,69	2,08	7,23
PTTBC	25,27	18,51	1,36	0,09
PTNC	23,71	22,24	1,07	2,57
OSME	19,52	4,00	4,89	27,75
OMPA	18,58	16,86	1,10	1,75
RECA	15,03	8,28	1,82	2,04
ACEE	11,58	6,17	1,88	0,72
LPDA	6,53	3,48	1,87	0,65
RPSA	3,90	0,66	5,90	2,79
MALP	3,61	0,35	10,43	2,25
RPOC	3,31	1,25	2,65	2,23
RPOB	2,39	1,00	2,39	2,32
GYRA	0,61	0,16	3,85	3,32
GROL	0,58	0,18	3,26	3,51
RPOA	0,20	0,05	3,60	2,00
RPOD	0,12	0,04	2,90	2,79
DNAK	0,03	-	-	3,10
ACEF	10,35	5,97	1,73	0,84
UbiE	9,63	1,45	6,63	seulement dans 4
UbiF	1,72	0,53	3,26	89,69
UbiI	1,06	0,03	32,44	43,00
UbiK	2,35	-	seulement dans 2	seulement dans 4
UbiH	0,81	-	seulement dans 2	seulement dans 4
UbiJ	0,47	-	seulement dans 2	seulement dans 4
UbiG	0,26	-	seulement dans 2	seulement dans 4

Tableau 10 : Effet de la délétion d'*ubiJ* sur l'abondance des protéines détectées dans les fragments de gel de haut poids moléculaire. Tableau présentant les 10 protéines les plus abondantes dans le fragment 2, les protéines contrôles (en gris) et les protéines Ubi (en bleu). Les iBAQ correspondants dans les fragments 2 et 3 sont indiqués pour chaque protéine. Les rapports des iBAQ 2/3 et 4/5 sont également montrés pour chaque protéine.

En comparant les échantillons 2 et 3, la délétion d'*ubiJ* n'affecte pas drastiquement le niveau des protéines abondantes dans le fragment 2 et ni celui des protéines contrôles (sauf RpsA et MalP). L'effet le plus marquant est pour le niveau d'abondance des protéines Ubi où les

protéines UbiK, UbiH, UbiJ et UbiG ne sont plus détectées dans le fragment 3 (comparez iBAQ 2 et iBAQ 3, tableau 10). De plus, les protéines UbiE, UbiI et UbiF sont enrichies dans le fragment 2 (voir rapport 2/3, tableau 10). De même, la comparaison des fragments 4 et 5 démontrent que l'abondance de la plupart des protéines contrôle n'est pas fortement affectée par la délétion d'*ubiJ* alors que celle des protéines Ubi l'est profondément (voir rapport 4/5, tableau 10). Les résultats obtenus sont en accord avec les signaux détectés en western blot pour les protéines UbiH, UbiF et UbiI dans un fond génétique $\Delta ubiJ$ (figure 51) et constituent un argument supplémentaire en faveur d'un rôle crucial de la protéine UbiJ pour la structuration de ces protéines dans le complexe Ubi de haut poids moléculaire.

5-f-ii- La délétion d'*ubiJ* affecte le niveau d'expression d'autres protéines

Comme décrit ci-dessus, la délétion d'*ubiJ* affecte spécifiquement l'abondance des protéines Ubi parmi les protéines rapportées dans le tableau 10. Le tableau 11 montre que la délétion d'*ubiJ* affecte aussi l'abondance d'autres protéines. Ce tableau montre les protéines les plus abondantes du fragment 2 qui sont fortement affectées par la délétion d'*ubiJ* dans le fragment 3 (17 protéines sont uniquement détectées dans le fragment 2 et 16 protéines dont le rapport 2/3 est très élevé).

	UbiH- SPA 1000 kDa	UbiH- SPA Δ ubiJ 1000 kDa				
protéine	iBAQ2 (%)	iBAQ3 (%)	rapport 2/3	rapport 4/5	Localisation (membranaire ou soluble)	Fonction
FRDA	4,90	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	sous-unité de la fumarate réductase
FRDB	4,06	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	sous-unité de la fumarate réductase
FRDC	3,71	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	sous-unité de la fumarate réductase
MBHM	2,95	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	hydrogénase
UbiK	2,35	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire (nos conditions)	Biosynthèse de Q ₈
YDIY	2,11	0	seulement dans 2	non détectée	non déterminée	non déterminée
YHBT	2,00	0	seulement dans 2	non détectée	non déterminée	rôle non catalytique dans la biosynthèse de Q ₈ (voir chapitre IV)
RCSF	1,52	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membrane externe	Rôle dans la transcription
DCUB	1,17	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	transporteur membranaire anaérobique
RS18	1,16	0	seulement dans 2	seulement dans 5	soluble	sous-unité ribosomale
MBHL	1,12	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	hydrogénase
UbiH	0,81	0	seulement dans 2	seulement dans 4	double localisation (nos conditions)	Biosynthèse de Q ₈
QMCA	0,80	0	seulement dans 2	non détectée	Membranaire	Rôle dans le contrôle de qualité des protéines membranaires intégrales
NARI	0,80	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	sous-unité de la nitrate réductase
DmsB	0,43	0	seulement dans 2	non détectée	Membranaire	sous-unité de la DMSO réductase
DmsA	0,31	0	seulement dans 2	seulement dans 4	Membranaire	sous-unité de la DMSO réductase
FRDD	0,46	-	seulement dans 2	non détectée	Membranaire	sous-unité du fumarate réductase
DCUA	10,88	0,88	18,578	12,41	Membranaire	transporteur membranaire anaérobique
NARG	4,93	0,25	10,597	19,50	Membranaire	sous-unité du nitrate réductase
NARH	4,29	0,08	9,962	51,24	Membranaire	sous-unité du nitrate réductase
RS5	3,71	0,12	6,007	31,60	soluble	sous-unité ribosomale
RL13	3,08	0,28	2,704	10,95	soluble	sous-unité ribosomale
SYT	2,72	0,11	12,047	24,17	soluble	thréonine tRNA ligase
OPGG	2,15	0,14	3,404	15,27	soluble	induite dans le cas d'un stress osmotique
YJIY	2,10	0,14	seulement dans 4	14,64	Membranaire	induite dans le cas des dommages d'ADN
LON	1,97	0,12	17,809	15,94	soluble	sérine protéase
YEDE	1,26	0,06	seulement dans 4	21,80	Membranaire	fonction inconnue
UBII	1,06	0,03	43	32,44	double localisation (nos conditions)	Biosynthèse de Q ₈
HSLU	1,04	0,03	4,27	31,97	soluble	sous-unité de l'ATPase d'un complexe de dégradation proteasome-like.
YHII	0,83	0,07	seulement dans 4	11,38	protéine transmembranaire	non déterminée

CLPA	0,82	0,04	3,674	20,15	Membranaire	Clp protéase ATP-dépendante
COPA	0,61	0,03	seulement dans 4	21,04	Membranaire	Exportation du cuivre
BLH	0,43	0,04	seulement dans 4	11,92	non déterminée	Beta-lactamase hydrolase

Tableau 11 : Effet de délétion d'*ubiJ* sur l'abondance des protéines. Tableau présentant deux catégories de protéines : **Catégorie A** : les 17 premières protéines qui sont uniquement détectées dans le fragment 2 (rapport 2/3 : seulement dans 2) et **catégorie B** : les 16 premières protéines dont la délétion d'*ubiJ* entraîne un rapport 2/3 très élevé. Ces protéines sont classées par ordre décroissant des iBAQ2 dans chaque catégorie. Le rapport des iBAQ 4/5 des protéines est également montré (rapport 4/5 avec 4 : UbiI-SPA 800 kDa et 5 : UbiI-SPA $\Delta ubiJ$ 800 kDa). La fonction ainsi que la localisation cellulaire de chaque protéine est indiquée. Les protéines de la fumarate réductase sont indiquées en vert, DMSO réductase en bleu foncé, ribosomale en marron, nitrate réductase en orange et biosynthèse de Q₈ en bleu clair.

La majorité des protéines indiquées dans le tableau 11 sont membranaires alors que c'est la fraction soluble qui est analysée par protéomique. L'origine de cette contamination de la fraction soluble par la fraction membranaire pourrait être la présence de sucrose dans le tampon utilisé dans la préparation des échantillons ce qui empêche la bonne précipitation des membranes. La délétion d'*ubiJ* induit un changement drastique dans le niveau d'abondance des sous-unités de plusieurs complexes respiratoires anaérobies dans la zone 1 MDa: FrdA, FrdB, FrdC et FrdD sont les sous-unités de la fumarate réductase, uniquement détectées dans le fragment 2 (comparez iBAQ2 et iBAQ3, tableau 11) ; DmsA et DmsB sont deux sous-unités de la DMSO réductase uniquement détectées dans le fragment 2 (tableau 11) ; NarI, fait partie du complexe nitrate réductase, est uniquement détectée dans le fragment 2 et les signaux enregistrés de deux sous-unités NarG et NarH sont très enrichis dans le fragment 2 en comparant au fragment 3 (rapport 2/3, tableau 11). La délétion d'*ubiJ* affecte aussi des protéines hydrogénases induites lors de la fermentation comme MBHL et MBHM. L'effet de la délétion d'*ubiJ* a été observé également pour ces protéines dans le fragment de 800 kDa (voir rapport 4/5). Il est surprenant que l'abondance de nombreuses protéiques anaérobies dans les fragments de gel à 1000 kDa et à 800 kDa soit fortement réduite par la délétion d'*ubiJ*. Ceci pourrait être expliqué soit par un effet métabolique de la délétion d'*ubiJ*, soit par un effet global de la délétion d'*ubiJ* (voir discussion).

Discussion

La présence d'un complexe de biosynthèse de Q₈ a été suggérée par une étude ancienne de Knoell qui a mis en évidence un complexe soluble de masse 2 MDa capable de convertir de

l'OPP marqué en Q₈ marqué (**Knoell 1979**). Cette masse a été estimée par chromatographie de filtration sur gel. Cependant, plusieurs études protéomiques récentes effectuées sur des fractions solubles d'*E. coli* n'ont pas détecté les protéines Ubi (**Lasserre et al. 2006; Pan et al. 2011**). L'hypothèse de l'existence du complexe de biosynthèse de Q₈ a tout d'abord été étayée par des expériences de double hybride bactérien effectuées par nos collaborateurs à Marseille. En effet, les résultats ont montré que la majorité des protéines de biosynthèse de Q₈ dont UbiJ et UbiK sont en interaction. Dans cette étude nous mettons en évidence la détection en gel BN-PAGE de plusieurs protéines Ubi à une masse moléculaire élevée supportant l'idée de leur présence au sein d'un complexe protéique.

Afin de pouvoir visualiser les protéines Ubi, nous avons eu recours à l'étiquetage de celles-ci par un tag SPA. En effet, les anticorps que nous avons tenté de développer contre plusieurs Ubi se sont révélés inefficaces pour détecter ces dernières dans des extraits cellulaires. Ceci peut être en partie lié à la faible abondance des protéines Ubi dans la cellule. En effet, une étude protéomique récente sur les protéines périphériques de la membrane interne chez *E. coli* a montré que les protéines Ubi se trouvent en quelques centaines de copies par cellule seulement (UbiE : 367 copies/cellules ; UbiD : 147 copies/cellule ; UbiG : 401 copies/cellule ; UbiH : 550 copies/cellule ; UbiJ : 37 copies/cellule) (**Papanastasiou et al. 2013**). Cette abondance est moins importante que celle observée pour des protéines faisant partie des complexes protéiques respiratoires membranaires. En effet, pour le complexe ATP synthase, AtpB se trouve en 11526 copies/cellule, AtpA se trouve en 6385 copies/cellule (**Papanastasiou et al. 2013**). J'ai vérifié que le tag SPA n'affecte pas drastiquement l'activité de la protéine Ubi marquée et que cette protéine est détectée (sauf UbiA et UbiB) à sa taille théorique (figures 39 et 40). Nous n'avons pas pu détecter UbiA-SPA par western blot malgré plusieurs essais avec des extraits cellulaires totaux et des fractions membranaires, ce qui nous a empêché de travailler avec la seule protéine Ubi intégrale à la membrane (**Cheng and Li 2014**). Toutefois, l'analyse des autres souches Ubi-SPA s'est révélée informative.

Le fractionnement cellulaire de différentes souches Ubi-SPA a montré que la plupart des protéines (UbiC, UbiE, UbiF, UbiH, UbiI, UbiF)-SPA sont réparties entre les fractions membranaire et soluble (figure 41). D'après nos résultats en western blot, les protéines UbiX-SPA et UbiG-SPA sont des protéines solubles alors qu'UbiK-SPA est une protéine exclusivement membranaire. En revanche, l'analyse protéomique montre qu'UbiK est détectée dans la fraction soluble. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Carrica *et al.* chez *S. typhimurium* qui ont montré qu'UbiK se répartit entre fractions membranaires et solubles

(Carrica *et al.* 2011). Nos résultats du chapitre II montrent que la protéine UbiK est faiblement associée à la membrane et qu'en utilisant le tampon de lyse 4, UbiK est détectée dans la fraction soluble. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la distribution d'UbiK par analyse sur gel BN-PAGE de la fraction soluble préparée à partir du tampon 4 afin de vérifier si UbiK-SPA est détectable autour de 1 MDa comme plusieurs protéines Ubi.

La prénylation du 4-HB par UbiA se fait précocement dans la voie de biosynthèse de Q₈. Ainsi tous les intermédiaires de biosynthèse sont liposolubles et vraisemblablement ancrés au sein des bicouches lipidiques s'ils ne sont pas liés à des protéines. Sur la base de cette considération et en prenant en compte le modèle du complexe de biosynthèse de Q proposé chez la levure *S. cerevisiae*, nous sommes partis de l'hypothèse que le complexe multiprotéique Ubi pourrait être membranaire. Puisque la plupart des protéines Ubi sont détectables par western-blot au moins en partie dans la fraction membranaire, nous avons initialement concentré nos efforts sur l'analyse des fractions membranaires des différentes souches Ubi-SPA sur BN-PAGE. L'analyse sur BN-PAGE des fractions membranaires solubilisées des souches Ubi-(E,F,H,I)-SPA montre que ces protéines sont détectées à leur taille théorique (figure 43B) ce qui suggère que ces protéines ne sont pas localisées dans un complexe sous leur forme associée à la membrane. En revanche, l'analyse sur BN-PAGE des fractions membranaires solubilisées de la souche UbiK-SPA montre que cette protéine est distribuée entre 180 et 480 kDa ; la protéine UbiJ-SPA est quant à elle détectée à 180 kDa (figure 44A). Les signaux de ces protéines se recouvrent partiellement au niveau de la zone de 180 kDa (figure 44A). Nous avons montré que la délétion d'*ubiK* dans UbiJ-SPA entraîne la disparition du signal à 180 kDa et la détection de la protéine à sa taille théorique (figure 44A). Réciproquement, la délétion d'*ubiJ* dans UbiK-SPA entraîne la disparition du signal à 180 kDa (figure 44A). Ces observations s'ajoutent aux résultats obtenus par nos collaborateurs (filtration sur gel, double hybride bactérien, double hybride de levure et co-immunoprécipitation) pour dire que les protéines UbiK et UbiJ sont en interaction au niveau de la membrane. Cependant, UbiK est probablement associée à d'autres protéines puisqu'un signal entre 250 kDa-480 kDa subsiste en absence d'*ubiJ* (figure 44A). UbiA, une protéine possédant plusieurs domaines transmembranaires ne fait pas partie du complexe formé par UbiJ et UbiK puisque la mutation d'*ubiA* n'altère pas les signaux détectés pour UbiK-SPA et UbiJ-SPA (figure 44A). Ce résultat est en accord avec les expériences de double hybride bactérien qui montrent une interaction d'UbiA uniquement avec UbiB (voir introduction, partie IV).

L'analyse des fractions solubles des souches Ubi-(F-H-I-J)-SPA en BN-PAGE a révélé la détection de ces protéines à un poids moléculaire élevé (800 kDa-1000 kDa) (figure 46). L'analyse par protéomique du fragment du gel BN-PAGE d'une souche UbiI-SPA à une taille de protéines correspondant à 800 kDa nous a permis de résoudre l'ambiguïté concernant la migration d'UbiI-SPA à 800 kDa plutôt qu'à 1000 kDa comme les autres Ubi. La présence du tag SPA en 3' d'*ubiI* entraîne la dissociation d'une ou plusieurs protéines du complexe de 1000 kDa et ainsi la migration du complexe à 800 kDa. Cette dissociation doit se passer dans le tampon de lyse et lors de la migration sur le gel BN-PAGE mais le complexe doit être intact dans la cellule puisqu'une souche UbiI-SPA biosynthétise un taux en coenzyme Q₈ proche de celui d'une souche WT (figure 39). Nos résultats d'analyse protéomique ont confirmé la présence aux alentours de 1000 kDa des protéines UbiF, UbiH, UbiI et UbiJ mais aussi celle des protéines UbiE, UbiG et UbiK. L'ensemble de nos résultats nous permet de proposer un modèle du complexe Ubi en interaction avec la membrane plasmique (figure 52).

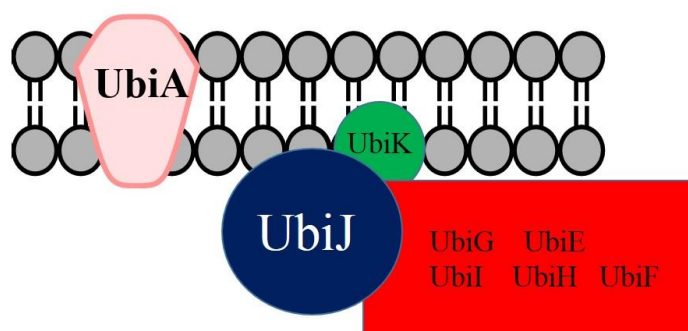


Figure 52 : Modèle de répartition des protéines Ubi au sein de la membrane plasmique d'*E. coli*.

Dans ce modèle UbiK est une protéine associée à la membrane formant un complexe avec UbiJ. UbiA est une protéine intégrale à la membrane qui ne fait pas partie du complexe UbiJ-UbiK. UbiJ fait également partie d'un complexe soluble regroupant UbiI, UbiF, UbiH, UbiE et UbiG. Ainsi, UbiJ pourrait assurer la liaison entre le complexe soluble et le complexe membranaire ce qui aboutirait à un complexe associé à la membrane tel qu'observé chez la levure (**Allan *et al.* 2015**).

Concernant les autres protéines Ubi (UbiE-SPA, UbiG-SPA et UbiX-SPA et UbiC-SPA), leur détection par western-blot dans les fractions solubles est en cours d'expérimentation. Nous avons aussi montré l'importance d'UbiJ pour la stabilité du complexe soluble puisque la délétion d'*ubiJ* dans les souches Ubi-(H, I, F)-SPA entraîne la disparition du signal des

protéines à (800-1000 kDa) (figure 51). Ce résultat a été validé aussi par analyse protéomique d'un fragment de gel correspondant à une taille de protéines aux alentours de 1000 kDa de la souche UbiH-SPA $\Delta ubiJ$. Cette analyse a révélé l'absence des protéines UbiE, UbiH, UbiI et UbiG à une masse moléculaire élevée si *ubiJ* est muté. De plus, un mutant $\Delta ubiJ$ ne biosynthétise que très peu de Q₈ (1% du WT) en conditions aérobies malgré le fait que les niveaux des protéines Ubi ne soient pas diminués. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère que les protéines Ubi doivent être structurées dans un complexe multiprotéique de haut poids moléculaire afin d'être actives dans la biosynthèse de Q₈ et que la protéine UbiJ joue un rôle crucial dans l'assemblage et / ou la stabilité de ce complexe. C'est la première fois que l'importance fonctionnelle d'un complexe de biosynthèse de Q est mise en évidence. En effet, dans toutes les expériences (avec des mutants de délétion) chez *S. cerevisiae* montrant une disparition du complexe multiprotéique, plusieurs protéines Coq sont dégradées. Il est donc impossible d'établir dans ces conditions si le complexe a une importance fonctionnelle ou non contrairement à nos résultats chez *E. coli*.

L'analyse de la séquence d'UbiJ montre un domaine de liaison aux stérols du côté C-terminal. Nous proposons qu'UbiJ peut lier à travers ce domaine les intermédiaires de biosynthèse hydrophobes de Q afin de les présenter aux protéines Ubi du complexe soluble pour qu'elles modifient les différents intermédiaires. Cette hypothèse est en accord avec les résultats décrits dans le chapitre II concernant l'importance des 50 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale pour la fonction biologique d'UbiJ. Un rôle similaire de chaperone pour un intermédiaire de biosynthèse de Q a été proposé récemment pour Coq9, une protéine de fonction inconnue mais indispensable à la biosynthèse de Q₉ chez la souris (voir introduction IV.2) (Lohman *et al.* 2014). En revanche, le rôle d'UbiJ semble être plus global puisque i) un mutant $\Delta ubiJ$ accumule de l'OPP qui n'est pas spécifique d'une déficience d'une étape précise de la voie de biosynthèse de Q₈ et ii) nos résultats de BN-PAGE et de protéomique établissent que la délétion d'*ubiJ* entraîne la disparition du signal de haut poids moléculaire pour plusieurs protéines Ubi.

Nos résultats montrent que des protéines connues pour être des composantes des complexes respiratoires anaérobies sont également sous-représentées dans la région de 1 MDa lors de la délétion d'*ubiJ*. Ce résultat a besoin d'être complété par des analyses qui établiront si ces protéines anaérobies sont moins abondantes ou si c'est uniquement leur assemblage dans leurs complexes respectifs qui est affecté. En effet, la souche $\Delta ubiJ$ montre un phénotype de croissance déficient en comparant avec une souche WT à cause de la déficience de biosynthèse

de Q₈. L'ajout de Q₁ (analogue de Q₈ avec une unité isoprène) à une souche $\Delta ubiJ$ entraîne l'amélioration de croissance de cette souche à un taux identique à celui d'une souche WT (données non montrées). Au cas où la diminution d'abondance de ces protéines est due à un défaut de croissance de la souche, nous pourrions vérifier si l'ajout du Q₁ pourrait régler ce problème. Alternativement, le rôle structural d'UbiJ que nous proposons dans cette étude pourrait s'étendre aux autres complexes respiratoires et pas uniquement au complexe Ubi. En effet, la délétion d'*ubiJ* pourrait entraîner un défaut d'assemblage de ces complexes respiratoires.

UbiK est une protéine importante pour la biosynthèse de Q₈ en conditions aérobies puisqu'un mutant $\Delta ubiK$ accumule une grande quantité d'OPP et biosynthétise 20% de Q₈ comparant à une souche WT (voir chapitre II, figure 28). La délétion d'*ubiK* entraîne la déstabilisation de la distribution d'UbiF dans le complexe protéique de 1 MDa lors d'une analyse BN-PAGE en première dimension, alors qu'en deuxième dimension, UbiF-SPA apparaît toujours à une taille élevée. Ceci pourrait s'expliquer par une modification de l'accessibilité au tag SPA d'UbiF en absence d'UbiK qui affecterait la détection en western-blot après une migration en condition native (1D BN-PAGE) mais pas après la migration en 2^{ème} dimension en condition dénaturante. Nous n'avons pas observé d'effet de la délétion d'*ubiK* sur la structuration d'UbiI et UbiJ (figure 50). Ces résultats suggèrent que le complexe protéique de 1 MDa n'est pas affecté par la délétion d'*ubiK* en accord avec la biosynthèse de Q₈ dans la souche $\Delta ubiK$.

Il semble donc que l'association du complexe Ubi n'est pas altérée dans le mutant $\Delta ubiK$ et l'accumulation de l'OPP pourrait être due à un défaut d'association du complexe soluble à la membrane. Ainsi, l'OPP qui se forme suite à l'activité successive d'UbiA, UbiX et UbiD (qui ne font pas partie du complexe soluble) a une accessibilité réduite au complexe soluble ce qui explique la biosynthèse de 20% de Q₈.

Le complexe détecté à haut poids moléculaire en BN-PAGE contient pour le moment les protéines UbiI, UbiJ, UbiH, UbiF, UbiE, UbiG et UbiK. Les protéines UbiF, UbiH, UbiI, UbiJ et UbiK sont essentielles en aérobiose uniquement. Vu la présence d'UbiJ et d'UbiK dans les deux complexes membranaire et soluble, ces protéines pourraient servir comme « adaptateurs » pour recruter les hydroxylases aérobies dans le complexe. A ce titre, il sera intéressant d'étudier la distribution de ces protéines après culture en condition anaérobie.

L'ensemble de nos résultats en BN-PAGE et de protéomique établit que le complexe de biosynthèse de Q₈ est bien localisé à 1000 kDa. Ce résultat est différent du cas de *S.cerevisiae*

où il semble exister des sous-complexes de biosynthèse de Q_6 et pas un seul (**Allan *et al.* 2015; He *et al.* 2014**). En effet, les expériences effectuées par le laboratoire de Catherine Clarke montrent que la plupart des protéines Coq sont détectées à plusieurs poids moléculaire en BN-PAGE plutôt qu'un seul signal bien localisé à 1000 kDa comme notre cas. Le prochain défi consiste à purifier ce complexe de biosynthèse de Q_8 . Ceci constitue le seul moyen qui va permettre d'identifier ses composants et de préciser leur stœchiométrie.

Chapitre IV : Biosynthèse de Q₈ en anaérobiose

La biosynthèse de Q₈ nécessite trois réactions d'hydroxylation au niveau des positions 1, 5 et 6. Ces réactions impliquent successivement UbiI, UbiH et UbiF (réactions e, g et i respectivement, figure 12) qui seront nommées « hydroxylases aérobies » dans ce chapitre. Les souches *ΔubiH*, *ΔubiF* cultivées dans des conditions aérobies ne biosynthétisent pas de Q₈ et la souche *ΔubiI* ne biosynthétise que très peu de Q₈ (7%) (**Alexander and Young 1978a; Hajj Chehade et al. 2013**). En revanche, ces différentes souches cultivées dans des conditions anaérobies ont la capacité de biosynthétiser du Q₈ à un niveau WT (**Alexander and Young 1978a; Hajj Chehade et al. 2013**). Cette capacité de biosynthèse de Q₈ en conditions anaérobies est caractéristique des mutants de monooxygénases puisque les autres mutants de biosynthèse de Q₈ (*ubiE*-, *ubiG*- et *ubiA*-) sont déficients en Q₈ en conditions aérobies et anaérobies. Ainsi, il existe un système d'hydroxylation alternatif indépendant de ces trois protéines pour catalyser les réactions d'hydroxylation en anaérobiose. Les seules enzymes connues actuellement pour réaliser des réactions d'hydroxylation en absence de dioxygène appartiennent à la famille des enzymes à cofacteur à Molybdène (MoCo) telle que la xanthine oxydase (**Hille 2005b**). Ces hydroxylases diffèrent des monooxygénases à flavine par l'utilisation d'une molécule d'eau comme source d'oxygène pour hydroxyler leurs substrats. Avant le début de la thèse, Laurent Loiseau a inactivé les gènes *moaD*, *moaA* ou *moeA* dans une souche MG1655 afin de bloquer la biosynthèse de MoCo. L'analyse par HPLC-ECD des extraits lipidiques de ces souches cultivées en anaérobiose a montré un taux de Q₈ similaire à celui de la souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions. Ces résultats suggèrent que les hydroxylases anaérobies mises en jeu pour la biosynthèse de Q₈ ne dépendent pas de MoCo mais appartiennent plutôt à une nouvelle famille des hydroxylases. Dans ce chapitre, je détaillerai notre étude visant à identifier les hydroxylases anaérobies.

1- Biosynthèse anaérobique de Q₈ dans les mutants de monooxygénases

Comme déjà évoqué, des simples mutants *ΔubiH*, *ΔubiF* et *ΔubiI* ne biosynthétisent pas ou très peu de Q₈ en conditions aérobies mais ont un contenu normal en anaérobiose (**Alexander and Young 1978a; Hajj Chehade et al. 2013**). Afin de valider ces données, Laurent Loiseau a construit des doubles mutants *ΔubiFΔubiI* et *ΔubiHΔubiI* et le triple mutant

ΔubiFΔubiHΔubiI. Tous ces mutants ne biosynthétisent pas de Q₈ en conditions aérobies (données non montrées). Ces différentes souches ont été cultivées en anaérobiose dans du milieu riche LB et un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1 mg de cellules a été analysé par HPLC-ECD afin de quantifier le Q₈ (figure 53).

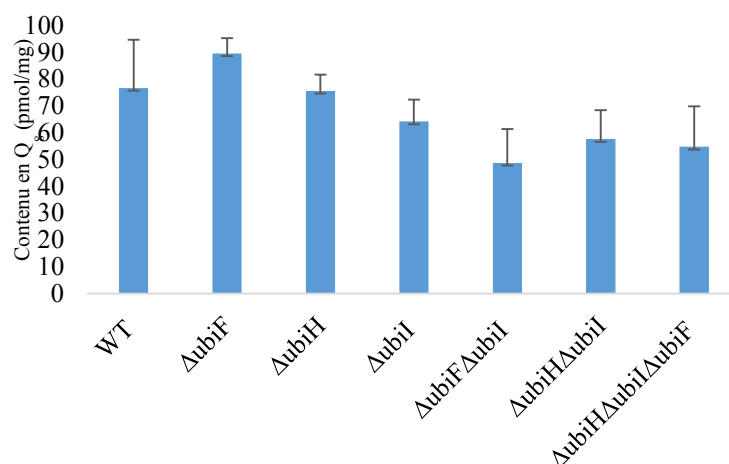


Figure 53 : Contenu en Q₈ des souches mutantes : Quantification du taux de Q₈ par mg de matière fraîche. n=3.

Nos résultats montrent que les différentes souches accumulent du Q₈ en conditions anaérobies à un niveau comparable à celui d'une souche WT. Ces résultats sont consistants avec l'hypothèse d'Alexander et Young que des hydroxylases anaérobies remplaçant UbiH, UbiI et UbiF existent (Alexander and Young 1978a) et que la fonction de ces hydroxylases anaérobies est indépendante des hydroxylases aérobies.

2- Expression des protéines UbiH, UbiI et UbiF en conditions anaérobies

Nous avons utilisé les souches UbiH-SPA, UbiI-SPA et UbiF-SPA afin d'étudier l'expression des hydroxylases aérobies en fonction de l'oxygénation du milieu de culture. Les souches ont été cultivées en présence et en absence d'oxygène et la détection des protéines a été faite par western blot avec un anticorps anti-flag (figure 54).

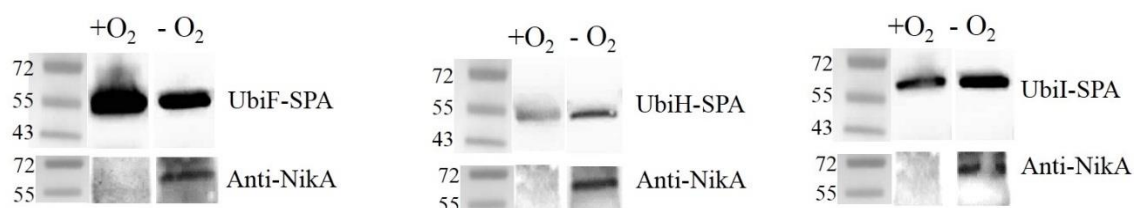


Figure 54 : Expression des protéines Ubi-SPA en présence (+O₂) ou en absence (-O₂) d'oxygène : Western blot des protéines Ubi-SPA à partir d'extraits cellulaires totaux de cultures aérobies et anaérobies. La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag du tag SPA. Dépôt sur gel SDS-PAGE des extraits cellulaires totaux dont la quantité est normalisée en fonction de la DO de la culture. L'anaérobiose a été vérifiée par utilisation du contrôle NikA qui est exprimée uniquement en absence d'oxygène. La détection de cette protéine se fait sur la même membrane que celle utilisée pour la détection avec l'anticorps anti-flag suite au stripping et à l'incubation avec un anticorps polyclonal anti-NikA.

Alors que NikA est détectée uniquement dans les cellules cultivées en anaérobiose, les hydroxylases aérobies sont détectées en présence et en absence de dioxygène (figure 54). Ainsi, même si ces protéines ne sont pas importantes pour la biosynthèse anaérobie de Q₈, elles sont exprimées en absence d'oxygène.

3- Recherche des hydroxylases anaérobies

Afin d'identifier les hydroxylases anaérobies, nous avons utilisé une approche génomique comparative de génomes de gammaprotéobactéries aérobies strictes (*Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* et *Alteromonas macleodii*) et aérobies facultatifs (*Xylella*, *E.coli* et *Shewanella*) (Collaboration avec Ducluzeau A.L.). Dans cette étude génomique comparative, nous avons décidé de ne pas inclure de génomes de bactéries anaérobies strictes malgré le fait que certaines de ces bactéries synthétisent Q₈ et donc possèdent probablement les gènes des hydroxylases anaérobies. En effet, le métabolisme de ces bactéries anaérobies est tellement différent de celui des bactéries aérobies strictes ou des bactéries anaérobies facultatives, incluant un grand nombre de gènes spécifiques des anaérobies ce qui compliquera l'analyse génomique comparative.

Cette approche est basée sur l'hypothèse que les gènes d'hydroxylases anaérobies sont absents des génomes des aérobies stricts mais présents dans les génomes des aérobies facultatifs. A partir d'une liste de 373 gènes communs aux génomes des aérobies facultatifs analysés mais absents des génomes des aérobies stricts (par exemple les gènes *men* impliqués dans la biosynthèse des ménaquinones sont présents dans cette liste), nous avons sélectionné 50 gènes candidats. Le choix de ces candidats a été fait en éliminant de la liste les gènes ayant une fonction connue et en choisissant préférentiellement les gènes inconnus sous le contrôle de Fnr / ArcA. Nous avons commandé les 50 mutants correspondants de la banque Keio (une collection de mutants des gènes non essentiels d'*E. coli* K-12 qui ont été inactivés par remplacement de l'ORF du gène par une cassette de résistance à la kanamycine). Ces mutants ont été cultivés en

conditions anaérobies et le contenu en Q₈ a été quantifié par analyse des extraits lipidiques par HPLC-ECD. OPP (composé 3, figure 12) est un intermédiaire qui s'accumule dans plusieurs mutants déficients pour la synthèse de Q₈ (*ΔubiG*, *ΔubiH*, *ΔubiJ* et *ΔubiK* cultivés en aérobie), ainsi nous avons quantifié son accumulation par HPLC couplée à la spectrométrie de masse.

Parmi les 50 gènes candidats, le gène *yhbT* a attiré notre attention puisque sa délétion entraîne une déficience en Q₈ après culture en conditions anaérobies alors que le taux de Q₈ est normal après culture en conditions aérobies (résultats non montrés). Suite à ces résultats, Laurent Loiseau a construit le mutant *ΔyhbT* dans un fond génétique MG1655. Cette nouvelle souche a été cultivée dans les mêmes conditions que le mutant Keio et le contenu en Q₈ est montré dans la figure 55A.

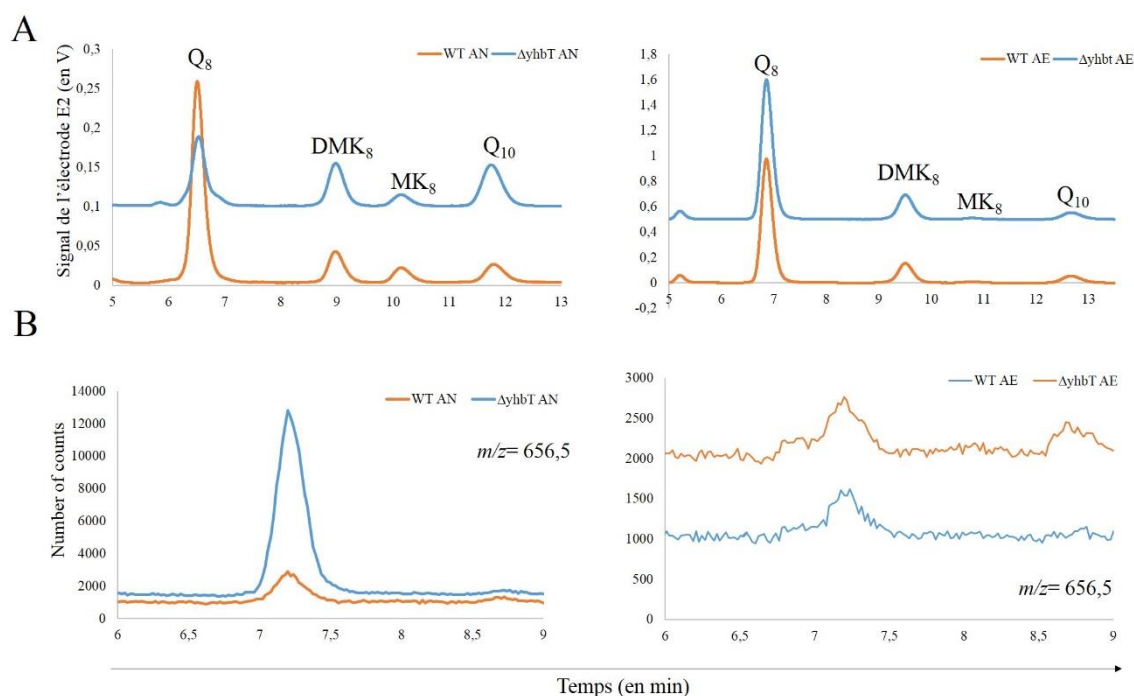


Figure 55 : (A) **Contenu en quinones des souches WT et *ΔyhbT*** : Les différentes souches sont cultivées dans du milieu LB en conditions aérobies (AE) ou en conditions anaérobies (AN). Un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1 mg de cellules est analysé en HPLC-ECD. Les pics correspondants à Q₈, OPP, DMK₈, MK₈ et au standard interne Q₁₀ sont indiqués sur les électrochromatogrammes. (B) ***ΔyhbT* accumule de l'OPP en conditions anaérobies** : Un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1mg de cellules des souches WT et *ΔyhbT* est analysé par HPLC-MS. Le chromatogramme représente le nombre de coups enregistrés par le spectromètre de masse à une masse *m/z* = 656,5 correspondante à la masse de l'OPP avec un induit ammonium en fonction du temps d'élution.

La souche *ΔyhbT* cultivée en anaérobiose accumule environ 30% de Q₈ par rapport à la souche WT. En revanche, la biosynthèse aérobie de Q₈ n'est pas affectée dans la souche *ΔyhbT* en comparant à la souche WT cultivée dans les mêmes conditions. La figure 55B montre le

chromatogramme enregistré par le spectromètre en mode positif pour les ions $m/z=656-657$ qui correspond à la masse de l'octaprénylphénol (OPP) avec un adduit ammonium. Les résultats montrent que la souche $\Delta yhbT$ accumule une quantité très importante d'OPP en comparant à une souche WT cultivée en anaérobiose. De façon intéressante, OPP ne s'accumule que très peu dans $\Delta yhbT$ cultivée en aérobiose et de façon comparable à une souche WT. Ainsi la déficience en Q_8 en anaérobiose est probablement due à un défaut de biosynthèse plutôt qu'une dégradation puisque il y a accumulation d'OPP.

yhbT constitue le premier gène dont la délétion entraîne une diminution de Q_8 et l'accumulation d'OPP exclusivement dans des conditions anaérobies. Comme déjà évoqué, l'OPP ne constitue pas un intermédiaire caractéristique d'une déficience d'une étape de biosynthèse. Ainsi nous ne pouvons pas attribuer une fonction catalytique à YhbT sur cette base et il n'est pas possible à ce stade d'établir si YhbT est une des hydroxylases anaérobies.

4- Etude de la souche YhbT-SPA

4-a- Quantification des quinones dans YhbT-SPA

L'étude déjà décrite dans le chapitre III pour les protéines Ubi-SPA a été faite pour YhbT-SPA afin de voir si le tag SPA affecte l'activité de la protéine. La souche YhbT-SPA a été cultivée dans du milieu riche LB en anaérobiose et un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1 mg de cellules a été analysé par HPLC-ECD afin de quantifier le taux de Q_8 . Le contenu en Q_8 formé par la souche YhbT-SPA est très proche de celui d'une souche WT ne contenant pas le tag SPA, ce qui indique que le tag SPA n'affecte pas l'activité de la protéine YhbT (figure 56A). De plus, la protéine YhbT-SPA est détectée à sa taille attendue (34 kDa) dans des extraits cellulaires totaux par western blot avec un anticorps anti-flag (figure 56B).

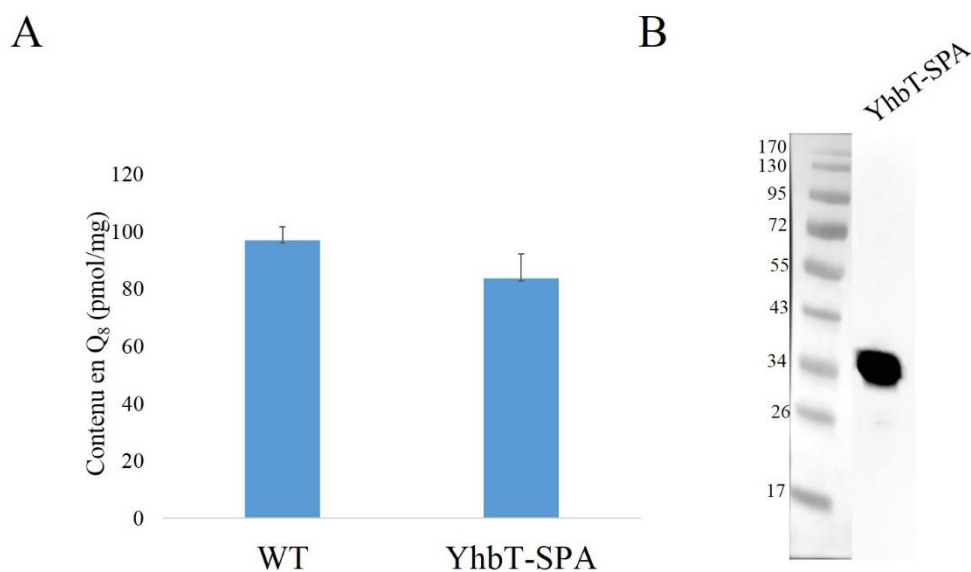


Figure 56 : (A) Contenu en Q₈ de la souche YhbT-SPA : Quantification du taux de Q₈ par mg de matière fraîche. n=3. (B) Détection de YhbT-SPA par un anticorps dirigé contre la séquence flag : Western blot de la protéine YhbT-SPA à partir d'extraits cellulaires totaux cultivées en conditions anaérobies séparés sur gel SDS 12%.

La souche YhbT-SPA sera donc utilisable pour vérifier si YhbT appartient à un complexe multiprotéique avec d'autres protéines Ubi.

4-b- Expression d'YhbT-SPA en anaérobiose

Vu l'importance de la protéine YhbT pour la biosynthèse anaérobie de Q₈, nous avons étudié l'expression de cette protéine dans les deux conditions de culture (en présence et en absence de dioxygène). La souche YhbT-SPA a été cultivée dans du milieu LB. La détection des protéines se fait après migration des extraits cellulaires totaux sur gel SDS suivie par western blot grâce à un anticorps anti-flag (figure 57).

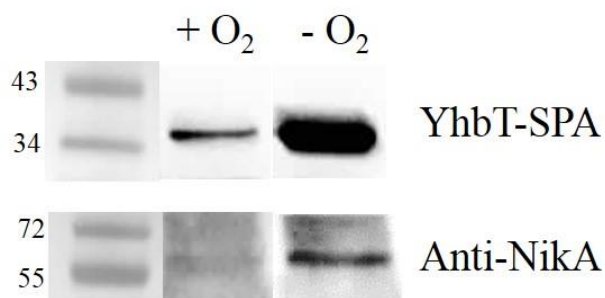


Figure 57 : Expression de protéine YhbT-SPA en présence (+O₂) ou en absence (-O₂) d'oxygène : Western blot de la protéine YhbT-SPA à partir d'extraits cellulaires totaux de cultures aérobies et anaérobies. La détection se fait grâce à un anticorps dirigé contre la séquence flag. La protéine contrôle NikA a été détectée de façon similaire à ce qui a été décrit dans la figure 54.

Nos résultats montrent que la protéine YhbT-SPA est beaucoup plus exprimée en conditions anaérobies tout comme la protéine contrôle NikA (figure 57). Récemment, une étude à grande échelle du génome d'*E. coli* a rapporté que *yhbT* est localisé en opéron avec *yhbS* et que l'opéron *yhbT-S* est régulé par FNR (Federowicz *et al.* 2014). Ainsi, la différence d'expression de la protéine YhbT montrée dans la figure 57 peut être due à une régulation transcriptionnelle via FNR.

Je n'ai pas pu avancer sur l'étude d'YhbT par manque du temps mais des expériences complémentaires doivent être faites afin de mieux caractériser cette protéine et son rôle dans la biosynthèse anaérobie de Q₈ (voir discussion).

5- Recherche de la source d'oxygène pour les réactions d'hydroxylation anaérobique

Nous avons essayé de chercher la nature du donneur des atomes d'oxygène ajoutés lors des réactions d'hydroxylation anaérobies. La source la plus probable est l'eau puisqu'elle est utilisée par les hydroxylases à cofacteur à molybdène (Hille 2005b). Ainsi, la souche sauvage WT et le triple mutant $\Delta ubiH\Delta ubiI\Delta ubiF$ (ΔHIF) ont été cultivés dans du milieu riche LB dissous dans de l'eau non marquée (H₂¹⁶O) ou marquée (H₂¹⁸O) (voir matériels et méthodes). L'incorporation de marquage dans les molécules de Q₈ formées lors de la culture a été suivie par HPLC-MS.

Dans les conditions contrôles, les souches WT et ΔHIF ont été cultivées en présence d'eau non marquée (H₂¹⁶O) en aérobiose (WT) et en anaérobiose (ΔHIF et WT). Le spectre de masse de l'ubiquinone formée en aérobiose dans la souche WT montre un ion majoritaire à $m/z=744$ qui est caractéristique de l'adduit ammonium de la forme oxydée de Q₈ (C₄₉H₇₄¹⁶O₄ + NH₄⁺) (figure 58A). On note également la présence d'un ion à $m/z=727$ correspondant à l'adduit proton de Q₈ (C₄₉H₇₄¹⁶O₄ + H⁺). Le spectre obtenu pour l'ubiquinone formée en anaérobiose dans la souche ΔHIF est similaire (figure 58B).

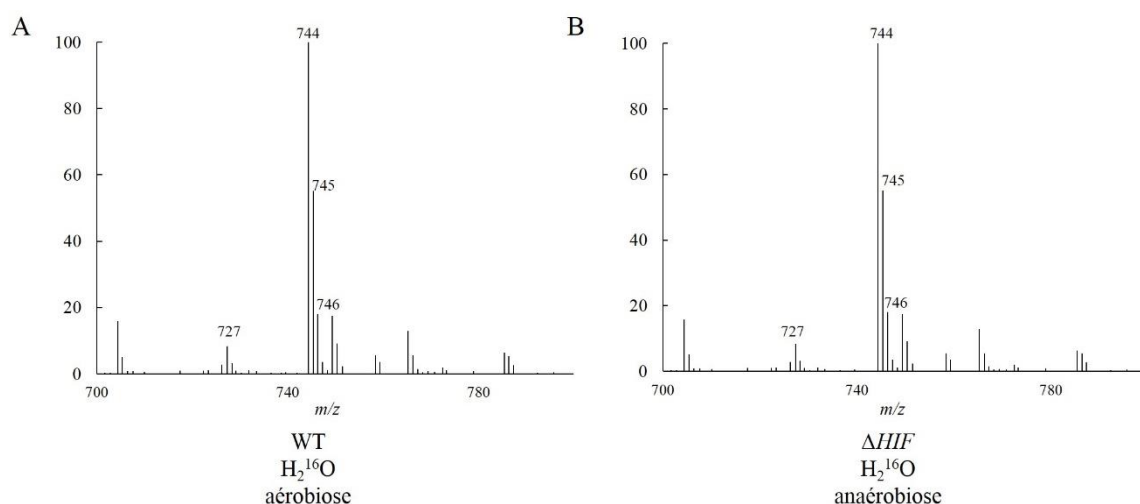


Figure 58 : Spectre de masse du Q₈ élué à 6,8 min lors de l'analyse des extraits lipidiques des souches WT et ΔHIF cultivées dans du LB dissout dans l'eau non marquée ($H_2^{16}O$).

Dans ces spectres, les ions à $m/z=745$ et $m/z=746$ représentent la distribution isotopique normale de Q₈ due principalement à l'abondance naturelle de l'isotope ^{13}C du carbone (^{12}C 98.93%, ^{13}C 1.07%).

souche	$H_2^{X}O$	condition	aire du pic à m/z			total des aires	Abondance relative des différents ions		
			744	746	748		744	746	748
WT	^{16}O	AE	323778	68303	5662	397743	81,4	17,2	1,4
	^{16}O	AN	9702	1534	292	11528	84,2	13,3	2,5
	^{18}O	AE	49977	82842	27472	160291	31,2	51,7	17,1
	^{18}O	AN	5929	4610	1801	12340	48,05	37,4	14,6
ΔHIF	^{16}O	AE	-	-	-	-	-	-	-
	^{16}O	AN	22465	4255	835	27555	81,5	15,4	3,03
	^{18}O	AE	-	-	-	-	-	-	-
	^{18}O	AN	7203	5339	1525	14067	51,2	37,9	10,8

Tableau 12 : Les souches WT et ΔHIF ont été cultivées dans du LB dissout dans de l'eau non marquée ($H_2^{16}O$) ou de l'eau marquée ($H_2^{18}O$) en conditions aérobies (AE) ou en conditions anaérobies (AN). L'abondance relative de chaque ion moléculaire est le pourcentage de l'aire de chaque pic par rapport à la somme des aires.

Parallèlement à ces spectres de masse, nous avons enregistré pour chaque échantillon les ions à $m/z=744$, 746 et 748 (figure 58). Le pic de chaque ion au temps de rétention de Q₈ a été intégré

afin d'obtenir une quantification de l'abondance relative des différents ions qui correspond soit à la distribution isotopique de l'ion à 744 soit à du marquage (lors d'une culture en H_2^{18}O). Ainsi, pour les cultures en présence de H_2^{16}O , le signal à 746 représente environ 21% de celui à 744, alors que le signal à 748 n'est que de 1-3% par rapport à celui à 744 (tableau 12).

Le spectre de masse de l'ubiquinone formée dans la souche WT cultivée en conditions anaérobies en présence de H_2^{18}O montre un ion à m/z de 744 correspondant à la masse de Q_8 non marqué. On note également la détection de pics à deux unités additionnelles ($m/z = 746$) et 4 unités additionnelles ($m/z = 748$) qui correspondent au marquage par 1 et 2 atomes de ^{18}O , respectivement (figure 59A). Le même profil est observé pour l'ubiquinone formée dans la souche ΔHIF cultivée en conditions anaérobies en présence de H_2^{18}O (figure 59B).

Pour la souche WT cultivée en présence de H_2^{18}O en anaérobiose, le spectre de masse de l'ubiquinone formée montre un ion majoritaire à $m/z=744$. Le pourcentage de la forme non marquée de Q_8 ($m/z=744$) diminue de 84% (en présence de H_2^{16}O) à 48% (tableau 12). En revanche, le taux des autres formes de Q_8 augmente (tableau 12). De même pour la souche ΔHIF cultivée en anaérobiose en présence de H_2^{18}O où le pourcentage de la forme non marquée de Q_8 diminue de 81% à 51 % accompagnée de l'augmentation du taux des formes marquées de Q_8 (tableau 12).

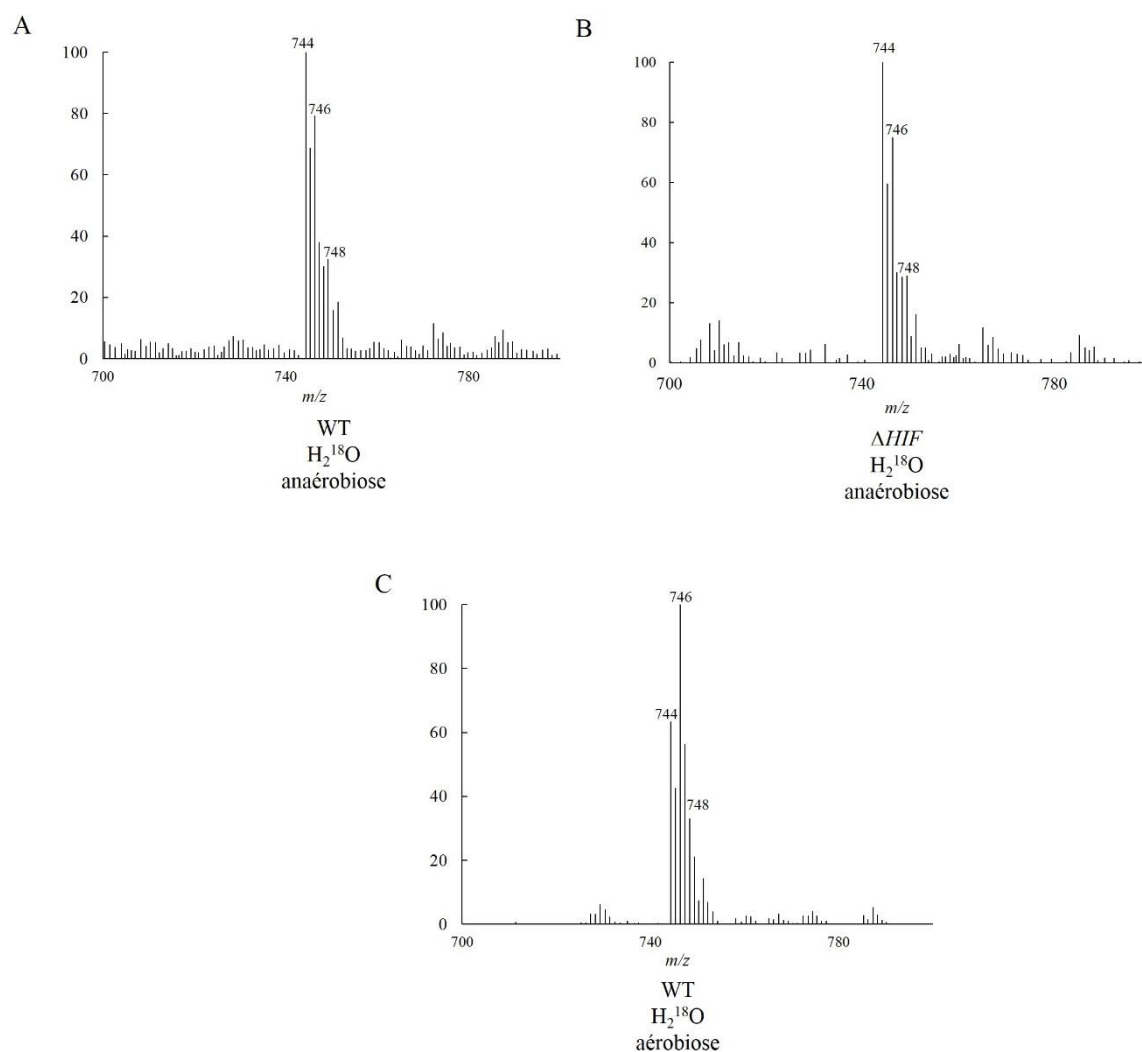


Figure 59 : Spectre de masse du Q_8 élué à 6,8 min lors de l'analyse des extraits lipidiques des souches WT et ΔHIF cultivées dans du LB dissout dans l'eau marquée ($H_2^{18}O$).

Afin de vérifier si ces unités de masse additionnelles correspondent à une incorporation de ^{18}O lors de la biosynthèse ou bien s'il s'agit d'un simple échange chimique de ^{16}O avec ^{18}O présent dans le milieu, nous avons cultivé la souche WT en présence de $H_2^{18}O$ en conditions aérobies. Dans ces conditions, il a été établi que la source de l'oxygène incorporé dans la structure de Q_8 est l'oxygène moléculaire (**Alexander and Young 1978b**). Dans nos conditions, le spectre de masse de la forme majoritaire de l'ubiquinone formée a une masse m/z de 746 (2 unités additionnelles) (figure 59C). L'ion moléculaire de masse $m/z=744$ (forme de Q_8 non marquée) et celui de la forme de Q_8 avec 4 unités additionnelles ($m/z=748$) ont été aussi détectées avec un pourcentage de 31% et 17% respectivement. Ainsi, de l'oxygène marqué a été incorporé dans la structure de Q_8 même dans les conditions aérobies. Comme déjà évoqué dans

l'introduction, Alexander et Young ont effectués des expériences d'échange des atomes d'oxygène de Q₈ dans des conditions acides. Dans ces conditions, seul l'oxygène des groupements cétone est échangé mais l'oxygène des groupements méthoxyle ne l'est pas (Alexander and Young 1978b). Dans nos conditions, le pourcentage de marquage par un atome d'¹⁸O (ion à $m/z=746$) est même supérieur dans les conditions aérobies par rapport aux conditions anaérobies (environ 51% vs 37%, tableau 12). Ainsi, il est probable que le marquage observé en anaérobiose correspond à l'échange des groupements cétone de Q₈ avec l'H₂¹⁸O du milieu plutôt qu'à une incorporation lors des réactions d'hydroxylation anaérobies. De plus, les réactions d'hydroxylation dans la voie de biosynthèse de Q₈ impliquent l'ajout de trois atomes d'oxygène, ainsi on s'attendrait à voir un marquage avec 6 unités additionnelles ($m/z=750$) si H₂O était la source d'oxygène. Ces observations montrent que le marquage observé dans Q₈ ne provient pas d'un marquage spécifique lors de la biosynthèse et suggèrent que la source d'oxygène utilisée pour les réactions d'hydroxylation anaérobie n'est pas l'eau.

6- *ΔubiE* cultivée en anaérobiose accumule de la déméthylubiquinone

Comme déjà évoqué dans l'introduction, la souche *ΔubiE* cultivée en aérobiose accumule du DDMQ₈ (composé 6, figure 12). En conditions aérobies, l'accumulation de la DDMQ₈ résulte de la déficience de la méthylation en C2 (absence d'*ubiE*). L'hydroxylation en C6 n'a pas eu lieu probablement car le substrat d'UbiF doit être méthylé en C2 (voir discussion chapitre I). En revanche, en anaérobiose la souche *ΔubiE* accumule du DDMQ₈ mais aussi un composé électroactif (X) de nature inconnue (figure 60). Il nous a paru important d'identifier ce composé afin de comprendre quelle est l'étape déficiente dans la voie de biosynthèse anaérobie de Q₈ qui conduit à l'accumulation de ce composé. Le composé X ainsi que le DDMQ₈ ont été purifiés selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes » et ensuite analysés par spectrométrie de masse à haute résolution en mode positif.

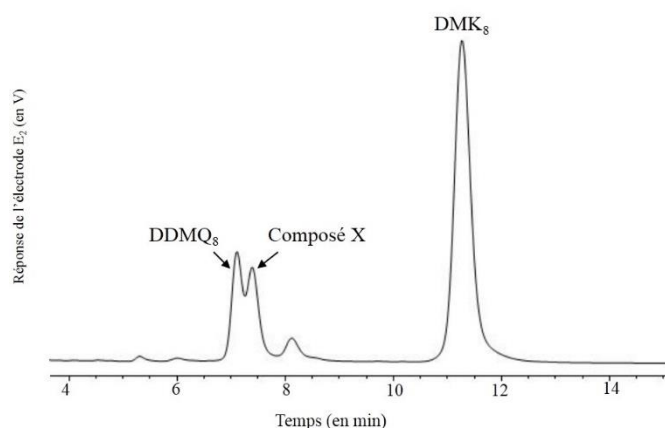


Figure 60 : Contenu en quinones de la souche *ΔubiE* cultivée en anaérobiose: La souche *ΔubiE* est cultivée dans du milieu LB en conditions anaérobies. Un aliquot d'extrait lipidique correspondant à 1 mg de cellules est analysé en HPLC-ECD. Les pics correspondants à DDMQ₈, au composé d'intérêt (composé X) et à DMK₈ sont indiqués sur l'électrochromatogramme.

6-a- Analyse de la DDMQ₈

Comme contrôle, nous avons analysé par spectrométrie de masse le DDMQ₈. Nous avons obtenu un pic de masse ($M+H^+$) avec un ratio m/z de 683.5403 qui correspond à la formule chimique brute ($C_{47}H_{71}O_3$, masse théorique 683.5397) de la molécule de DDMQ₈ (figure 61A). Dans le cas du coenzyme Q₈ et de ses dérivés, une fragmentation classiquement observée est celle qui conduit à la formation d'ions tropylium qui correspondent au noyau aromatique substitué avec un méthylène de la chaîne polyprényle (figure 63), ($m/z=197$ pour l'ion tropylium issu de la fragmentation de Q₈) (Alexander and Young 1978b). Le spectre de fragmentation de l'ion moléculaire 683.5403 montre un ion à $m/z=153.0547$ qui correspond à l'ion tropylium ($C_8H_9O_3$) issu de DDMQ₈ (figure 61B).

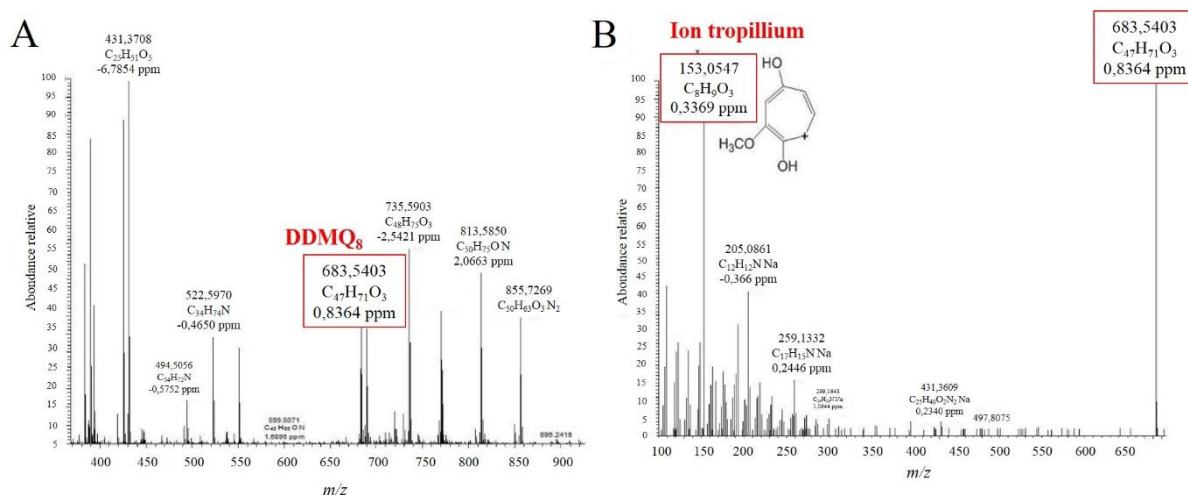


Figure 61 : (A) Spectre de masse du DDMQ₈ purifié à 7,3 min par analyse des extraits lipidiques de la souche *ΔubiE* cultivée dans du LB en conditions anaérobies. (B) Spectre de fragmentation de l'ion moléculaire 683,54.

6-b- Analyse du composé d'intérêt

Le composé d'intérêt X a été aussi analysé par spectrométrie de masse. Nous avons obtenu un pic de masse ($M+H^+$) avec un ratio *m/z* de 713.5513 (figure 62A). La masse exacte du proton étant 1.0078. Nous avons soumis la masse moléculaire du composé ($M=713.5513 - 1.0078 = 712.5435$) à plusieurs logiciels de prédiction de formule chimique. En considérant les atomes N, H, C et O, C₄₈H₇₂O₄ est la formule chimique la plus compatible avec la masse mesurée (M C₄₈H₇₂O₄ = 712.5425; masse observée = 712.5435 ; différence de masse = 1 ppm). La masse *m/z* de l'ion tropillium issu de la fragmentation de l'ion moléculaire C₄₈H₇₃O₄ est égale à 183,0653 (C₉H₁₀O₄ + H⁺) (figure 62B). Le spectre de fragmentation est en accord avec la présence d'une chaîne octaprényle dans la molécule X et la masse *m/z* de l'ion tropillium à 183,0653 (C₉H₁₀O₄ + H⁺) (figure 62B) est inférieure de 14 unités de masse en comparant avec l'ion tropillium issu de Q₈ (*m/z*=197) (Alexander and Young 1978b). Ainsi les masses à haute résolution de l'ion moléculaire du composé X et de l'ion tropillium issu de sa fragmentation sont compatibles avec une molécule de Q₈ à laquelle il manque un groupement méthyle (figure 63). La position du groupement méthyle manquant ne peut pas être établie grâce à la spectrométrie de masse, néanmoins, le fait que le composé X s'accumule spécifiquement dans le mutant *ubiE*- laisse penser que c'est le groupement méthyle en position C2 qui est absent dans la molécule X. Nous proposons donc que la molécule X correspond au 2-déméthyl-coenzyme Q₈ (DQ₈) (figure 63).

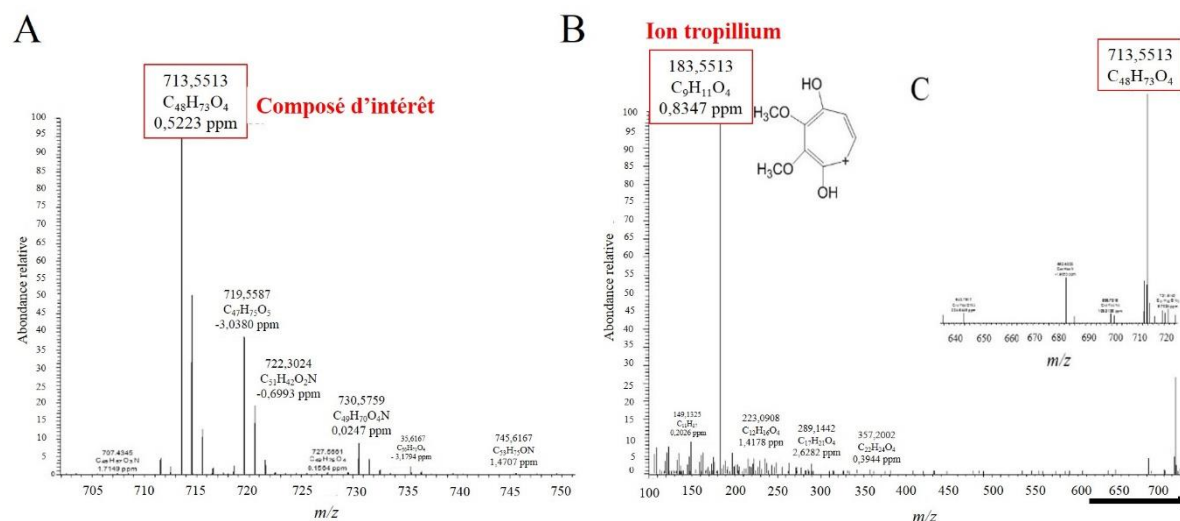


Figure 62 : (A) Spectre de masse du composé d'intérêt purifié élué à 7,5 min par analyse des extraits lipidiques de la souche *ΔubiE* cultivée dans du LB en conditions anaérobies. (B) Spectre de fragmentation de l'ion moléculaire 713,5513. (C) Zoom sur la région $m/z=640-720$ du spectre de fragmentation du B.

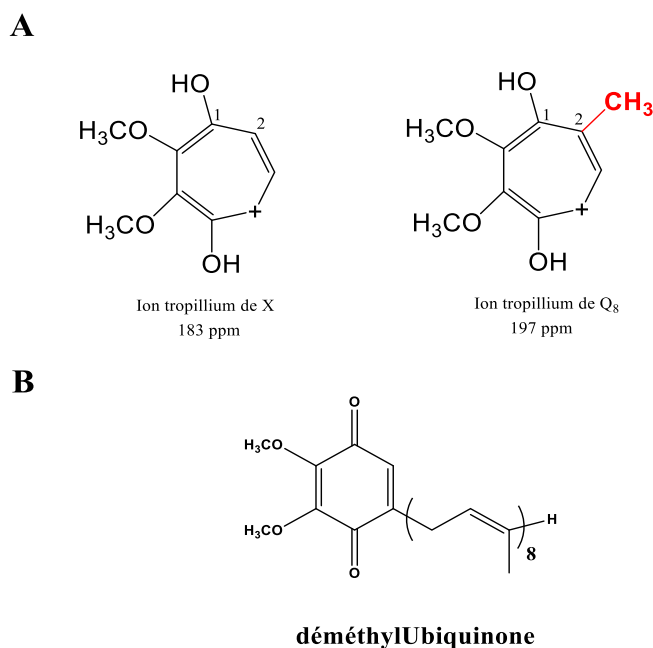


Figure 63 : (A) Structure des ions tropilliums du composé d'intérêt (X) et du coenzyme Q₈. (B) structure du déméthylubiquinone (DQ₈).

Dans une souche WT cultivée en anaérobiose, UbiE assure la méthylation en C2 pour former le DMQ₈, ensuite l'hydroxylase anaérobie en C6 assure l'hydroxylation de cet atome de carbone (C6) suivie par une méthylation en O6 par UbiG (figure 64). Dans le mutant *ΔubiE*, la méthylation en C2 ne s'effectue pas vu l'absence d'UbiE. Cependant, la formation de DQ₈ s'expliquerait par la capacité de l'hydroxylase anaérobie en C6 d'hydroxyler le DDMQ₈ malgré

l'absence du méthyle en C2. Cette hydroxylation est ensuite suivie par la méthylation en O6, aboutissant à la formation de DQ₈. Puisque seul le DDMQ₈ est détecté dans une souche *ubiE*- cultivée en aérobie, nous en déduisons que la protéine UbiF qui assure l'hydroxylation C6 en condition aérobie n'est pas capable d'hydroxyler DDMQ₈. UbiF est donc dépendante de la présence d'un groupement méthyl en C2 sur son substrat, contrairement à ce que nous observons pour l'hydroxylase anaérobie en C6.

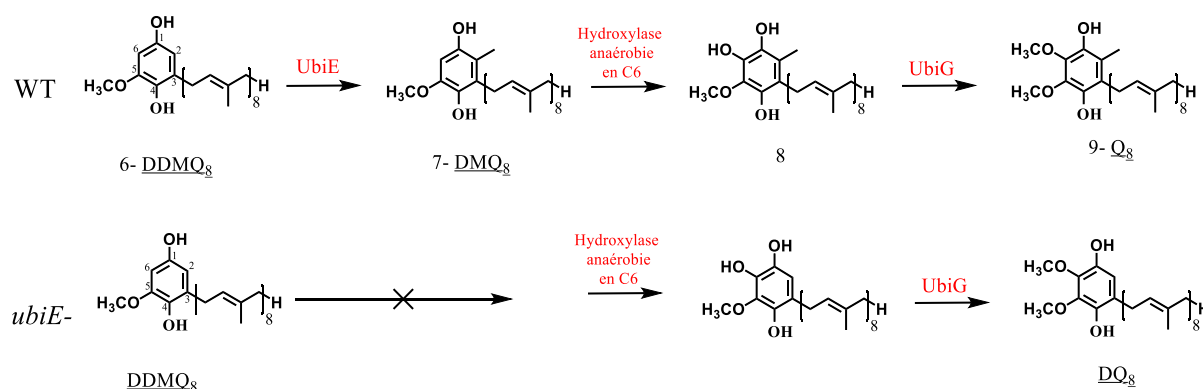


Figure 64 : Voie de biosynthèse de Q₈ et de DQ₈ dans les souches WT et $\Delta ubiE$ cultivées en anaérobiose.

Discussion

E. coli est une bactérie anaérobie facultative ayant la capacité de biosynthétiser Q₈ dans des conditions aérobies et anaérobies. Ces deux voies de biosynthèse diffèrent entre elles par les protéines catalysant les réactions d'hydroxylation. Alors que les hydroxylases aérobies sont identifiées (UbiH, UbiF, UbiI), les hydroxylases anaérobies sont inconnues à ce jour. En accord avec le fait que les simples mutants *ubiH*-, *ubiF*- et *ubiI*- présentent un contenu sauvage en Q₈ lorsqu'ils sont cultivés en condition anaérobie (Alexander and Young 1978a), nous avons observé qu'un triple mutant $\Delta ubiH\Delta ubiI\Delta ubiF$ cultivé en conditions anaérobies présente un contenu WT en Q₈ (figure 53). Ces résultats démontrent i) que des hydroxylases anaérobies se substituent à UbiH, UbiF et UbiI pour réaliser les réactions d'hydroxylation nécessaires à la biosynthèse de Q₈ en condition anaérobie et ii) que la fonction des hydroxylases anaérobies est indépendante des hydroxylases aérobies. L'existence d'hydroxylases anaérobies est rationnelle car le groupement hydroxyle qui est introduit sur le substrat lors des réactions d'hydroxylation aérobies catalysées par UbiH, UbiF et UbiI provient du dioxygène (Alexander and Young

1978b). Or, ces enzymes ne peuvent pas fonctionner en conditions anaérobies (absence de dioxygène). L'existence de ce système d'hydroxylation anaérobie avait déjà été proposée en 1978 (**Alexander and Young 1978a**) et le but de ce chapitre a été d'identifier des enzymes impliquées dans ces réactions d'hydroxylation anaérobie.

Seules des enzymes à cofacteur à molybdène (MoCo) telles que la xanthine déshydrogénase sont connues pour réaliser des réactions d'hydroxylation n'impliquant pas le dioxygène comme co-substrat (**Hille 2005b**). Le mécanisme réactionnel implique l'attaque nucléophile du groupement OH coordonné au Mo sur le substrat relativement pauvre en électrons (**Hille 2005a**). Or, les intermédiaires de biosynthèse de Q sont aromatiques et donc riches en électrons ce qui n'est pas favorable à un tel mécanisme. En collaboration avec Laurent Loiseau à Marseille, nous avons vérifié que des souches d'*E. coli* incapables de produire le cofacteur à Molybdène sont toujours capables de synthétiser Q₈ en anaérobiose. Ce résultat démontre que les réactions d'hydroxylations anaérobies de la voie de biosynthèse de Q₈ ne sont pas catalysées par une enzyme MoCo. Ainsi, les hydroxylases anaérobies que nous cherchons à identifier pourraient représenter une nouvelle classe d'enzyme qui est probablement largement distribuée parmi les organismes anaérobies. En effet, plusieurs études démontrent la possibilité pour certains microorganismes anaérobies d'hydroxyler des substrats riches en électrons (par exemple, hydroxylation du benzène par *Geobacter metallireducens*) (**Vogt et al. 2011; Zhang et al. 2013**) mais les protéines responsables de ces réactions biochimiques ne sont pas identifiées. A ce jour, nous ne savons pas si trois hydroxylases anaérobies existent pour hydroxyler les trois positions du cycle aromatique dans la biosynthèse anaérobie de Q₈ (comme dans le cas de la biosynthèse aérobie avec les trois hydroxylases UbiI, UbiH et UbiF) ou bien si une seule enzyme est capable d'hydroxyler les trois positions du cycle aromatique.

Une analyse génomique comparative des génomes de bactéries aérobies strictes et aérobies facultatives montrent que le gène *yhbT* qui est important pour la biosynthèse anaérobie de Q₈ est absent des génomes des bactéries aérobies strictes. L'importance d'*yhbT* pour la biosynthèse de Q₈ en absence d'oxygène a été démontrée par le fait que sa délétion diminue le contenu en Q₈ dans la souche mutante et entraîne l'accumulation d'OPP (figure 55). L'analyse de séquence de la protéine YhbT montre que cette protéine a 18 % et 19% d'identité de séquence avec SCP2 de *Yarrowia lipolytica* et UbiJ de *E.coli* respectivement. Vu que les protéines SCP2 et UbiJ possèdent des domaines de liaison aux lipides (stérols), il est possible qu'YhbT joue un rôle général dans la biosynthèse anaérobie de Q₈ comme une protéine chaperone des intermédiaires de biosynthèse (tel que discuté pour UbiJ en condition aérobie, chapitre III)

plutôt qu'un rôle spécifique dans une étape d'hydroxylation. Un mutant $\Delta yhbT$ n'accumule pas d'intermédiaires diagnostiques d'une déficience dans une étape d'hydroxylation (4HP₈ pour l'hydroxylation en C5 et DMQ₈ pour l'hydroxylation en C6), donc nous ne pouvons pas attribuer une fonction d'hydroxylation à YhbT. Cependant, la formation de DQ₈ dans $\Delta ubiE$ cultivée en anaérobiose montre que l'hydroxylase anaérobie en C6 est tout comme UbiF n'a pas la même spécificité qu'UbiF puisqu'elle est capable d'effectuer l'hydroxylation en C6 sans le méthyle en C2. Ainsi, il est envisageable que le blocage d'une même étape dans la voie de biosynthèse puisse entraîner l'accumulation d'intermédiaires différents en aérobie et anaérobie ; par exemple un mutant d'hydroxylase anaérobie en C5 pourrait ne pas accumuler le 4HP₈ mais d'autres intermédiaires.

Récemment, une étude à grande échelle de l'expression du génome d'*E. coli* a rapporté qu'*yhbT* est localisé en opéron avec *yhbS* et l'opéron *yhbT-S* est régulé par FNR (**Federowicz et al. 2014**). Ainsi, la différence d'expression de la protéine YhbT montrée dans la figure 57 peut être due à une régulation transcriptionnelle. La délétion d'*yhbS* n'a pas d'effet sur le contenu en Q₈ en anaérobiose (données non montrées) mais malheureusement l'apport d'un plasmide contenant le gène *yhbT* dans une souche $\Delta yhbT$ ne restaure pas la biosynthèse de Q₈ en conditions anaérobies. L'expression élevée d'YhbT en anaérobiose corrèle donc avec son importance pour la biosynthèse de Q₈ dans ces conditions. En revanche, nos résultats montrent que les protéines UbiI, UbiH et UbiF sont constitutivement exprimées dans la cellule (figure 54) alors qu'elles ne sont pas fonctionnelles en anaérobiose. La présence des protéines UbiF, UbiH et UbiI en anaérobiose pourrait représenter un moyen pour *E. coli* de s'adapter rapidement à un changement d'environnement (retour à des conditions aérobies) en augmentant sa biosynthèse de Q₈. Nous souhaitons prochainement tester par BN-PAGE si, lors d'une culture en anaérobiose, les protéines UbiF, UbiH et UbiI sont associées à un complexe de haut poids moléculaire tel que nous avons pu le mettre en évidence dans des conditions aérobies. Il sera également intéressant de vérifier la distribution d'YhbT-SPA et d'établir si la délétion d'*yhbT* a un effet ou non sur la distribution des protéines Ubi en anaérobiose. Il est important de noter que la taille apparente du complexe protéique sur BN-PAGE pourrait changer en fonction des conditions de culture (aérobiose ou anaérobiose) vu que le jeu de protéines impliquées dans la biosynthèse de Q₈ n'est pas le même dans les deux conditions.

En se basant sur l'hypothèse que les hydroxylases anaérobies font partie du complexe protéique de biosynthèse de Q₈, il est envisageable d'identifier ces hydroxylases anaérobies en purifiant

le complexe à partir des cellules cultivées en conditions anaérobies et en identifiant ses composants.

Afin de caractériser le mécanisme d'action utilisé par les hydroxylases anaérobies, nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à établir l'identité du donneur d'oxygène pour ces hydroxylases. Nos résultats montrent que la culture du triple mutant ΔHIF en présence d'eau marquée ($H_2^{18}O$) en anaérobiose entraîne la même incorporation de marquage dans Q_8 que celle observée dans une souche WT cultivée en aérobie, suggérant que l'eau n'est pas la source d'oxygène utilisée par les hydroxylases anaérobies. Cependant, ces expériences ont été réalisées dans du milieu riche LB qui pourrait ne pas être un milieu optimal dans ce cas car un accepteur final d'électrons anaérobique n'est pas présent (nitrate par exemple). Cette expérience doit être répétée dans un milieu minimum contenant du glucose, nitrate et de l' $H_2^{18}O$. S'il n'y a toujours pas de marquage observé dans Q_8 formée dans ces conditions, il faudra alors envisager que le donneur d'oxygène puisse être soit un métabolite dérivé du glucose, soit le nitrate et essayer de vérifier cela par des expériences de marquage métabolique.

E. coli a vraisemblablement mis en jeu des enzymes spécifiques pour biosynthétiser du coenzyme Q_8 en anaérobiose, ainsi Q_8 produit en absence d'oxygène doit avoir une ou plusieurs fonctions qui sont inconnues à ce jour. Dans des conditions microaérophiles, *E. coli* adopte un métabolisme mixte de fermentation d'une part et de respiration aérobie d'autre part soutenue par la forte affinité de la quinol *bdI* oxydase à l'oxygène (voir introduction). Q_8 joue un rôle majeur comme étant un donneur d'électrons à l'ubiquinol *bdI* oxydase (voir introduction). Ainsi, il est possible que Q_8 pourrait jouer un rôle dans les conditions microaérophiles comme étant le donateur d'électrons à la quinol *bdI* oxydase. De plus, comme évoqué dans l'introduction, Sevin et Sauer ont proposé un rôle de Q_8 dans la stabilité de la membrane plasmique contre un stress osmotique. Ainsi, Q_8 pourrait contribuer à cette fonction dans des conditions anaérobies. Une fois que les gènes codant pour les hydroxylases anaérobies seront connus, il faudra cultiver les souches mutantes correspondantes dans des conditions anaérobies et évaluer l'effet de l'ajout de NaCl sur la stabilité de la membrane plasmique. De cette façon, nous pourrions vérifier si Q_8 joue un rôle dans la stabilité de membrane plasmique lors d'un stress osmotique en conditions anaérobies.

En conclusion, les résultats de ce chapitre nous ont permis d'avancer sur la compréhension de la voie de biosynthèse anaérobie de Q_8 grâce à l'identification d'*yhbT* et au résultat qu' H_2O n'est probablement pas le donneur d'oxygène des réactions d'hydroxylation anaérobies. *yhbT* est le premier gène impliqué spécifiquement dans la biosynthèse anaérobie de Q_8 .

Conclusion générale

La voie de biosynthèse de Q₈ chez la bactérie *E. coli* a été étudiée depuis longtemps. La plupart des gènes a été identifiée par des études effectuées par Alexander, Young, Cox et leurs collaborateurs dans les années 70-80. La biosynthèse de Q₈ comporte huit étapes et implique au moins neuf protéines (UbiA-UbiH et UbiX). Alors que toutes les protéines catalysant les différentes étapes de biosynthèse semblaient connues, nous avons identifié trois nouvelles protéines (VisC, YqiC et YigP) importantes pour le métabolisme de Q₈ puisque leur mutation entraîne une diminution importante du contenu en Q₈ dans les souches mutantes. Nous avons montré que ces trois protéines en question interagissent avec la plupart des protéines connues pour participer à la biosynthèse de Q ce qui implique l'existence d'un complexe de biosynthèse de Q. Nous avons aussi des résultats préliminaires montrant l'existence d'hydroxylases anaérobies remplaçant les hydroxylases aérobies connues lorsqu'*E.coli* est cultivée en absence d'oxygène.

Le but du projet de thèse a été d'une part de confirmer la fonction de VisC, d'élucider la fonction d'YigP et d'YqiC dans la voie de biosynthèse de Q par des approches génétiques et biochimiques, d'identifier les hydroxylases anaérobies et d'autre part, de confirmer la présence du complexe protéique par approches biochimiques et d'établir sa composition par approche protéomique.

Trois réactions d'hydroxylation sont nécessaires pour la biosynthèse de Q₈ en conditions aérobies. Alors que les protéines UbiH et UbiF présentent des homologies de séquence avec des monooxygénases à flavine connues pour catalyser des réactions d'hydroxylation, UbiB qui a été proposée comme étant la troisième hydroxylase, présente uniquement une homologie de séquence avec des kinases. Durant ce travail nous avons levé l'ambiguïté entourant le rôle d'UbiB et nous avons clairement montré que la protéine VisC (renommée dans ce travail UbiI) est une monooxygénase à flavine qui est impliquée directement dans la réaction d'hydroxylation en C5. Les protéines UbiH et UbiF n'ont pas été étudiées *in vitro* mais il est probable que ces 2 protéines partagent avec UbiI un mécanisme d'hydroxylation similaire impliquant un cofacteur flavinique comme pour la PHBH, le prototype de cette famille. Des réponses claires sur ce point n'ont pas été obtenues car UbiI est instable en solution et ne contient pas de FAD sous forme purifiée. Il a donc été impossible pour nos collaborateurs de

développer un test d'activité *in vitro* d'UbiI purifiée mais la structure cristallographique d'UbiI a cependant permis de confirmer la présence d'un site de liaison du FAD.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle des protéines YigP et YqiC (renommées UbiJ et UbiK respectivement) dans la biosynthèse de Q₈. Nous avons démontré que ces deux protéines sont importantes pour la biosynthèse aérobie de Q₈ malgré leur expression similaire en présence et en absence d'oxygène. Ces deux protéines ne semblent pas avoir un rôle catalytique puisque les souches mutantes correspondantes accumulent le même intermédiaire (OPP, composé 3, figure 12) qui n'est pas caractéristique d'une déficience dans une étape précise de la voie de biosynthèse suggérant plutôt un rôle global pour ces protéines.

Des données de nos collaborateurs à Marseille montrent qu'UbiK interagit avec les 50 derniers acides aminés d'UbiJ. Nos résultats montrent que les deux protéines UbiJ et UbiK forment un complexe associé à la membrane et que la délétion d'une protéine affecte la distribution de l'autre sur un gel BN-PAGE. UbiJ et UbiK sont en interaction avec d'autres protéines Ubi dans les expériences de double hybride bactérien. Ces données sont en accord avec l'existence d'un complexe protéique dans la fraction soluble regroupant différentes protéines Ubi telle que démontrée par notre combinaison de western-blot et d'analyse protéomique d'extraits cellulaires analysés sur gel BN-PAGE.

Les protéines UbiI, UbiH, UbiF, UbiJ UbiK, UbiE et UbiG sont détectées dans un complexe soluble dont la taille est estimée à 1000 KDa en BN-PAGE. La présence d'UbiJ dans un complexe membranaire avec UbiK et dans un complexe soluble avec Ubi-(K-E-G-I-H-F) nous ont poussés à étudier l'importance de cette protéine pour la stabilité du complexe soluble à 1000 kDa. Nos résultats d'analyse sur BN-PAGE démontrent que la délétion d'*ubiJ* affecte la distribution des protéines UbiI, UbiH et UbiF qui ne sont plus détectées à ce poids moléculaire élevé. Ce résultat a été validé par analyse protéomique qui montre que les protéines Ubi ne sont plus détectées à ce poids moléculaire élevé suggérant qu'UbiJ joue un rôle structural important pour le complexe Ubi. A l'inverse, la délétion d'*ubiK* ne semble pas avoir d'effet sur la cohésion du complexe. L'ensemble de nos résultats établit pour la première fois l'existence d'un complexe protéique regroupant plusieurs protéines Ubi dans la fraction soluble et l'étude du mutant *ΔubiJ* pointe l'importance fonctionnelle du complexe Ubi pour la biosynthèse de Q₈. Outre son rôle pour la structuration du complexe Ubi, UbiJ pourrait jouer le rôle d'une protéine chaperone en liant les intermédiaires de biosynthèse et en les présentant aux différentes protéines Ubi afin qu'elles modifient les substituants du noyau aromatique de ces intermédiaires de biosynthèse. En effet, la partie C-terminale d'UbiJ contient un domaine de liaison aux lipides

(stérols) et nous avons montré qu'un peptide correspondant aux 50 derniers acides aminés du côté C-terminal d'UbiJ conserve une activité biologique dans la biosynthèse de Q₈.

La biosynthèse de Q₈ s'effectue en anaérobiose indépendamment des protéines UbiI, UbiH, UbiF, UbiJ et UbiK. Le modèle de répartition des protéines Ubi dans un complexe protéique que nous proposons dans cette étude n'est donc valable qu'en conditions aérobies. Nos résultats montrent que ces protéines sont exprimées de façon similaire dans les deux conditions de culture. A ce titre, il sera intéressant d'étudier la distribution de ces protéines sur BN-PAGE à partir de cellules cultivées en anaérobiose. Dans ce travail, nous avons identifié *yhbT* comme étant un nouveau gène impliqué dans la biosynthèse anaérobie de Q₈. L'accumulation d'OPP dans un mutant $\Delta yhbT$ suggère un rôle global plutôt que catalytique dans la biosynthèse de Q₈. Le fait qu'*yhbT* possède un domaine de liaisons aux stérols comme UbiJ suggère qu'YhbT pourrait remplacer fonctionnellement UbiJ en absence d'oxygène. En effet, à travers ce domaine, YhbT pourrait lier les intermédiaires de biosynthèse et les présenter aux différentes protéines pour la modification des substituants. Il sera intéressant d'étudier la capacité de cette protéine à lier les lipides. De plus, il sera important de vérifier si un complexe multiprotéique existe en condition anaérobie et si YhbT joue un rôle dans la structuration de ce complexe qui pourrait contenir les hydroxylases anaérobies qui restent inconnues à ce jour.

L'ensemble de ce travail de thèse a donc permis d'avancer significativement dans la compréhension de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₈ par l'élucidation du rôle de nouveaux acteurs de biosynthèse de Q₈ en absence et en présence d'oxygène. Ce travail a aussi permis de caractériser la présence d'un complexe protéique qui regroupe différentes protéines Ubi en condition aérobie. Ce travail a fait l'objet de deux publications parues dans « Journal of Biological Chemistry » et « Journal of Bacteriology ». Une troisième publication sur le complexe protéique est en cours de préparation.

Références bibliographiques

- Adachi, A., N. Shinjyo, D. Fujita, H. Miyoshi, H. Amino, Y. Watanabe, and K. Kita. 2003. 'Complementation of Escherichia coli ubiF mutation by Caenorhabditis elegans CLK-1, a product of the longevity gene of the nematode worm', *FEBS Letters*, 543: 174-8.
- Alexander, K., and I. G. Young. 1978a. 'Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in Escherichia coli', *Biochemistry*, 17: 4750-5.
- . 1978b. 'Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in Escherichia coli', *Biochemistry*, 17: 4745-50.
- Allan, C. M., A. M. Awad, J. S. Johnson, D. I. Shirasaki, C. Wang, C. E. Blaby-Haas, S. S. Merchant, J. A. Loo, and C. F. Clarke. 2015. 'Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in Saccharomyces cerevisiae', *Journal of Biological Chemistry*.
- Allan, C. M., S. Hill, S. Morvaridi, R. Saiki, J. S. Johnson, W. S. Liao, K. Hirano, T. Kawashima, Z. Ji, J. A. Loo, J. N. Shepherd, and C. F. Clarke. 2013. 'A conserved START domain coenzyme q-binding polypeptide is required for efficient Q biosynthesis, respiratory electron transport, and antioxidant function in Saccharomyces cerevisiae', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831: 776-91.
- Anemuller, S., and G. Schafer. 1990. 'Cytochrome aa3 from Sulfolobus acidocaldarius. A single-subunit, quinol-oxidizing archaebacterial terminal oxidase', *European Journal of Biochemistry*, 191: 297-305.
- Arias-Cartin, R., S. Lyubenova, P. Ceccaldi, T. Prisner, A. Magalon, B. Guigliarelli, and S. Grimaldi. 2010. 'HYSCORE evidence that endogenous mena- and ubisemiquinone bind at the same Q site (Q(D)) of Escherichia coli nitrate reductase A', *Journal of the American Chemical Society*, 132: 5942-3.
- Ashby, M. N., S. Y. Kutsunai, S. Ackerman, A. Tzagoloff, and P. A. Edwards. 1992. 'COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 267: 4128-36.
- Aussel, L., L. Loiseau, M. Hajj Chehade, B. Pocachard, M. Fontecave, F. Pierrel, and F. Barras. 2014. 'ubiJ, a New Gene Required for Aerobic Growth and Proliferation in Macrophage, Is Involved in Coenzyme Q Biosynthesis in Escherichia coli and Salmonella enterica Serovar Typhimurium', *Journal of Bacteriology*, 196: 70-9.
- Aussel, L., F. Pierrel, L. Loiseau, M. Lombard, M. Fontecave, and F. Barras. 2014. 'Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria', *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Baba, S. W., G. I. Belogradov, J. C. Lee, P. T. Lee, J. Strahan, J. N. Shepherd, and C. F. Clarke. 2004. 'Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 10052-9.
- Bader, M. W., T. Xie, C. A. Yu, and J. C. Bardwell. 2000. 'Disulfide bonds are generated by quinone reduction', *Journal of Biological Chemistry*, 275: 26082-8.
- Bartling, C. M., and C. R. Raetz. 2009. 'Crystal structure and acyl chain selectivity of Escherichia coli LpxD, the N-acyltransferase of lipid A biosynthesis', *Biochemistry*, 48: 8672-83.
- Bauer, C. E., S. Elsen, and T. H. Bird. 1999. 'Mechanisms for redox control of gene expression', *Annual Review of Microbiology*, 53: 495-523.
- Bekker, M., S. Alexeeva, W. Laan, G. Sawers, J. T. de Mattos, and K. Hellingwerf. 2010. 'The ArcBA Two-Component System of Escherichia coli Is Regulated by the Redox State of both the Ubiquinone and the Menaquinone Pool', *Journal of Bacteriology*, 192: 746-54.
- Belogradov, G. I., P. T. Lee, T. Jonassen, A. Y. Hsu, P. Gin, and C. F. Clarke. 2001. 'Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392: 48-58.

- Bentinger, M., K. Brismar, and G. Dallner. 2007. 'The antioxidant role of coenzyme Q', *Mitochondrion*, 7: S41-S50.
- Bhagavan, H. N., and R. K. Chopra. 2005. 'Potential role of ubiquinone (coenzyme Q10) in pediatric cardiomyopathy', *Clin Nutr*, 24: 331-8.
- Bonnefoy, V., and J. A. Demoss. 1994. 'Nitrate reductases in *Escherichia coli*', *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66: 47-56.
- Calhoun, M. W., and R. B. Gennis. 1993. 'Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenases in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 175: 3013-9.
- Carrica, M. C., P. O. Craig, V. A. Garcia-Angulo, A. Aguirre, E. Garcia-Vescovi, F. A. Goldbaum, and S. L. Cravero. 2011. 'YqiC of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a membrane fusogenic protein required for mice colonization', *BMC Microbiol*, 11: 95.
- Chen, Z., Y. Wang, Y. Li, Y. Li, N. Fu, J. Ye, and H. Zhang. 2012a. 'Esre: a novel essential non-coding RNA in *Escherichia coli*', *FEBS Letters*, 586: 1195-200.
- Chen, Zhichao, Yi Wang, Yarong Li, Yue Li, Nan Fu, Jiang Ye, and Huizhan Zhang. 2012b. 'Esre: A novel essential non-coding RNA in *Escherichia coli*', *Febs Letters*, 586: 1195-200.
- Cheng, W., and W. Li. 2014. 'Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes', *Science*, 343: 878-81.
- Clarke, C. F., W. Williams, and J. H. Teruya. 1991. 'Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene', *Journal of Biological Chemistry*, 266: 16636-44.
- Collins, M. D., and D. Jones. 1981. 'Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication', *Microbiol Rev*, 45: 316-54.
- Cotter, P. A., S. B. Melville, J. A. Albrecht, and R. P. Gunsalus. 1997. 'Aerobic regulation of cytochrome d oxidase (cydAB) operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation', *Molecular Microbiology*, 25: 605-15.
- Cox, G. B., and J. A. Downie. 1979. 'Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* K-12 affected in oxidative phosphorylation of quinone biosynthesis', *Methods in Enzymology*, 56: 106-17.
- Cox, G. B., and F. Gibson. 1964. 'Biosynthesis of Vitamin K and Ubiquinone. Relation to the Shikimic Acid Pathway in *Escherichia coli*', *Biochimica et Biophysica Acta*, 93: 204-6.
- Cox, G. B., I. G. Young, L. M. McCann, and F. Gibson. 1969. 'Biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli* K-12: location of genes affecting the metabolism of 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoic acid and 2-octaprenylphenol', *Journal of Bacteriology*, 99: 450-8.
- Crack, J. C., A. A. Gaskell, J. Green, M. R. Cheesman, N. E. Le Brun, and A. J. Thomson. 2008. 'Influence of the environment on the [4Fe-4S]₂⁺ to [2Fe-2S]₂⁺ cluster switch in the transcriptional regulator FNR', *Journal of the American Chemical Society*, 130: 1749-58.
- D'Mello, R., S. Hill, and R. K. Poole. 1995. 'The oxygen affinity of cytochrome bo' in *Escherichia coli* determined by the deoxygenation of oxyleghemoglobin and oxymyoglobin: Km values for oxygen are in the submicromolar range', *Journal of Bacteriology*, 177: 867-70.
- . 1996. 'The cytochrome bd quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity in vivo by oxygen inhibition', *Microbiology*, 142 (Pt 4): 755-63.
- Dassa, J., H. Fsihi, C. Marck, M. Dion, M. Kieffer-Bontemps, and P. L. Boquet. 1991. 'A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (appA)', *Mol Gen Genet*, 229: 341-52.
- de Pina, K., C. Navarro, L. McWalter, D. H. Boxer, N. C. Price, S. M. Kelly, M. A. Mandrand-Berthelot, and L. F. Wu. 1995. 'Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein NikA of *Escherichia coli* K12', *European Journal of Biochemistry*, 227: 857-65.
- Disch, A., and M. Rohmer. 1998. 'On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts', *FEMS Microbiology Letters*, 168: 201-8.

- Do, H., S. J. Kim, C. W. Lee, H. W. Kim, H. H. Park, H. M. Kim, H. Park, H. Park, and J. H. Lee. 2015. 'Crystal structure of UbiX, an aromatic acid decarboxylase from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* that undergoes FMN-induced conformational changes', *Sci Rep*, 5: 8196.
- Drapal, N., and G. Sawers. 1995. 'Purification of ArcA and analysis of its specific interaction with the pfl promoter-regulatory region', *Molecular Microbiology*, 16: 597-607.
- Echtay, K. S., E. Winkler, K. Frischmuth, and M. Klingenberg. 2001. 'Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 1416-21.
- el-Hachimi, Z., O. Samuel, and R. Azerad. 1974. 'Biochemical study on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* : I. Specificity of para hydroxybenzoate polyprenyltransferase', *Biochimie*, 56: 1239-47.
- Entsch, B., D. P. Ballou, M. Husain, and V. Massey. 1976. 'Catalytic mechanism of p-hydroxybenzoate hydroxylase with p-mercaptobenzoate as substrate', *Journal of Biological Chemistry*, 251: 7367-9.
- Entsch, B., D. P. Ballou, and V. Massey. 1976. 'Flavin-oxygen derivatives involved in hydroxylation by p-hydroxybenzoate hydroxylase', *Journal of Biological Chemistry*, 251: 2550-63.
- Eppink, M. H., H. A. Schreuder, and W. J. Van Berkel. 1997. 'Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding', *Protein Science*, 6: 2454-8.
- Federowicz, S., D. Kim, A. Ebrahim, J. Lerman, H. Nagarajan, B. K. Cho, K. Zengler, and B. Palsson. 2014. 'Determining the control circuitry of redox metabolism at the genome-scale', *PLoS Genetics*, 10: e1004264.
- Garcia-Corzo, L., M. Luna-Sanchez, C. Doerrier, J. A. Garcia, A. Guaras, R. Acin-Perez, J. Bullejos-Peregrin, A. Lopez, G. Escames, J. A. Enriquez, D. Acuna-Castroviejo, and L. C. Lopez. 2013. 'Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency', *Human Molecular Genetics*, 22: 1233-48.
- Gibson, F. 1973. 'Chemical and genetic studies on the biosynthesis of ubiquinone by *Escherichia coli*', *Biochemical Society Transactions*, 1: 317-26.
- Gibson, F., and I. G. Young. 1978. 'Isolation and characterization of intermediates in ubiquinone biosynthesis', *Methods in Enzymology*, 53: 600-9.
- Gin, P., and C. F. Clarke. 2005. 'Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 2676-81.
- Gin, P., A. Y. Hsu, S. C. Rothman, T. Jonassen, P. T. Lee, A. Tzagoloff, and C. F. Clarke. 2003. 'The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 25308-16.
- Gomez-Diaz, C., J. C. Rodriguez-Aguilera, M. P. Barroso, J. M. Villalba, F. Navarro, F. L. Crane, and P. Navas. 1997. 'Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q10 reductase in the plasma membrane', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29: 251-7.
- Guiral, M., L. Prunetti, S. Lignon, R. Lebrun, D. Moinier, and M. T. Giudici-Orticoni. 2009. 'New insights into the respiratory chains of the chemolithoautotrophic and hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*', *Journal of Proteome Research*, 8: 1717-30.
- Gulmezian, M., K. R. Hyman, B. N. Marbois, C. F. Clarke, and G. T. Javor. 2007. 'The role of UbiX in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467: 144-53.
- Gunsalus, R. P., and S. J. Park. 1994. 'Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons', *Research in Microbiology*, 145: 437-50.
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith. 1995. 'Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter', *Journal of Bacteriology*, 177: 4121-30.

- Hajj Chehade, M., L. Loiseau, M. Lombard, L. Pecqueur, A. Ismail, M. Smadja, B. Golinelli-Pimpaneau, C. Mellot-Draznieks, O. Hamelin, L. Aussel, S. Kieffer-Jaquinod, N. Labessan, F. Barras, M. Fontecave, and F. Pierrel. 2013. 'ubil, a New Gene in Escherichia coli Coenzyme Q Biosynthesis, Is Involved in Aerobic C5-hydroxylation', *Journal of Biological Chemistry*, 288: 20085-92.
- Hamilton, S. J., G. T. Chew, and G. F. Watts. 2007. 'Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus', *Diab Vasc Dis Res*, 4: 89-102.
- Hastings, S. F., T. M. Kaysser, F. Jiang, J. C. Salerno, R. B. Gennis, and W. J. Ingledew. 1998. 'Identification of a stable semiquinone intermediate in the purified and membrane bound ubiquinol oxidase-cytochrome bd from Escherichia coli', *European Journal of Biochemistry*, 255: 317-23.
- He, C. H., L. X. Xie, C. M. Allan, U. C. Tran, and C. F. Clarke. 2014. 'Coenzyme Q supplementation or over-expression of the yeast Coq8 putative kinase stabilizes multi-subunit Coq polypeptide complexes in yeast coq null mutants', *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Hille, R. 2005a. 'Molybdenum-containing hydroxylases', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433: 107-16.
- . 2005b. 'Molybdenum-containing hydroxylases', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433: 107-16.
- Hiratsuka, T., K. Furihata, J. Ishikawa, H. Yamashita, N. Itoh, H. Seto, and T. Dairi. 2008. 'An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms', *Science*, 321: 1670-73.
- Howlett, B. J., and J. Bar-Tana. 1980. 'Polyprenyl p-hydroxybenzoate carboxylase in flagellation of Salmonella typhimurium', *Journal of Bacteriology*, 143: 644-51.
- Hsieh, E. J., P. Gin, M. Gulmezian, U. C. Tran, R. Saiki, B. N. Marbois, and C. F. Clarke. 2007. 'Saccharomyces cerevisiae Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463: 19-26.
- Hsu, A. Y., T. Q. Do, P. T. Lee, and C. F. Clarke. 2000. 'Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1484: 287-97.
- Hsu, A. Y., W. W. Poon, J. A. Shepherd, D. C. Myles, and C. F. Clarke. 1996. 'Complementation of coq3 mutant yeast by mitochondrial targeting of the Escherichia coli UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis', *Biochemistry*, 35: 9797-806.
- Huang, H., E. J. Levin, S. Liu, Y. Bai, S. W. Lockless, and M. Zhou. 2014. 'Structure of a Membrane-Embedded Prenyltransferase Homologous to UBIAD1', *PLoS Biology*, 12: e1001911.
- Huijbers, M. M. E., S. MonTERSINO, A. H. Westphal, D. Tischler, and W. J. H. van Berkel. 2014. 'Flavin dependent monooxygenases', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544: 2-17.
- Husain, M., L. M. Schopfer, and V. Massey. 1978. 'P-Hydroxybenzoate hydroxylase and melilotate hydroxylase', *Methods in Enzymology*, 53: 543-58.
- Jacewicz, A., A. Izumi, K. Brunner, R. Schnell, and G. Schneider. 2013. 'Structural insights into the UbiD protein family from the crystal structure of PA0254 from Pseudomonas aeruginosa', *PLoS One*, 8: e63161.
- Jackman, L. M., I. G. O'Brien, G. B. Cox, and F. Gibson. 1967. 'Methionine as the source of methyl groups for ubiquinone and vitamin K: a study using nuclear magnetic resonance and mass spectrometry', *Biochimica et Biophysica Acta*, 141: 1-7.
- Jones, S. A., T. Gibson, R. C. Maltby, F. Z. Chowdhury, V. Stewart, P. S. Cohen, and T. Conway. 2011. 'Anaerobic respiration of Escherichia coli in the mouse intestine', *Infection and Immunity*, 79: 4218-26.
- Junemann, S. 1997. 'Cytochrome bd terminal oxidase', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1321: 107-27.
- Kagan, R. M., and S. Clarke. 1994. 'Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310: 417-27.
- Kainou, T., K. Okada, K. Suzuki, T. Nakagawa, H. Matsuda, and M. Kawamukai. 2001. 'Dimer formation of octaprenyl-diphosphate synthase (IspB) is essential for chain length determination of ubiquinone', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 7876-83.

- Kang, Y., K. D. Weber, Y. Qiu, P. J. Kiley, and F. R. Blattner. 2005. 'Genome-wide expression analysis indicates that FNR of Escherichia coli K-12 regulates a large number of genes of unknown function', *Journal of Bacteriology*, 187: 1135-60.
- Khoroshilova, N., H. Beinert, and P. J. Kiley. 1995. 'Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 2499-503.
- Knoell, H. E. 1979. 'Isolation of a soluble enzyme complex comprising the ubiquinone-8 synthesis apparatus from the cytoplasmic membrane of Escherichia coli', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 91: 919-25.
- Kobayashi, T., S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, and K. Ito. 1997. 'Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing Escherichia coli cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 11857-62.
- Kopeck, J., R. Schnell, and G. Schneider. 2011. 'Structure of PA4019, a putative aromatic acid decarboxylase from Pseudomonas aeruginosa', *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 67: 1184-8.
- Kwon, O., M. Druce-Hoffman, and R. Meganathan. 2005. 'Regulation of the ubiquinone (coenzyme Q) biosynthetic genes ubiCA in Escherichia coli', *Current Microbiology*, 50: 180-9.
- Kwon, O., D. Georgellis, and E. C. Lin. 2000. 'Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 182: 3858-62.
- Kwon, O., A. Kotsakis, and R. Meganathan. 2000. 'Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in Escherichia coli: identification of the ubiF gene', *FEMS Microbiology Letters*, 186: 157-61.
- Lasserre, J. P., E. Beyne, S. Pyndiah, D. Lapailleur, S. Claverol, and M. Bonneau. 2006. 'A complexomic study of Escherichia coli using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis', *Electrophoresis*, 27: 3306-21.
- Lee, P. T., A. Y. Hsu, H. T. Ha, and C. F. Clarke. 1997. 'A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the Escherichia coli ubiE gene', *Journal of Bacteriology*, 179: 1748-54.
- Leppik, R. A., I. G. Young, and F. Gibson. 1976. 'Membrane-associated reactions in ubiquinone biosynthesis in Escherichia coli. 3-Octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase', *Biochimica et Biophysica Acta*, 436: 800-10.
- Lin, F., K. L. Ferguson, D. R. Boyer, X. N. Lin, and E. N. Marsh. 2015. 'Isofunctional Enzymes PAD1 and UbiX Catalyze Formation of a Novel Cofactor Required by Ferulic Acid Decarboxylase and 4-Hydroxy-3-polyphenylbenzoic Acid Decarboxylase', *ACS Chemical Biology*.
- Lohman, D. C., F. Forouhar, E. T. Beebe, M. S. Stefely, C. E. Minogue, A. Ulbrich, J. A. Stefely, S. Sukumar, M. Luna-Sanchez, A. Jochem, S. Lew, J. Seetharaman, R. Xiao, H. Wang, M. S. Westphall, R. L. Wrobel, J. K. Everett, J. C. Mitchell, L. C. Lopez, J. J. Coon, L. Tong, and D. J. Pagliarini. 2014. 'Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Lynch, A. S., and E. C. Lin. 1996. 'Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of Escherichia coli: characterization of DNA binding at target promoters', *Journal of Bacteriology*, 178: 6238-49.
- Malpica, R., B. Franco, C. Rodriguez, O. Kwon, and D. Georgellis. 2004. 'Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 13318-23.
- Marbois, B., P. Gin, K. F. Faull, W. W. Poon, P. T. Lee, J. Strahan, J. N. Shepherd, and C. F. Clarke. 2005. 'Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 20231-8.

- McNeil, M. B., J. S. Clulow, N. M. Wilf, G. P. Salmond, and P. C. Fineran. 2012. 'SdhE is a conserved protein required for flavinylation of succinate dehydrogenase in bacteria', *Journal of Biological Chemistry*, 287: 18418-28.
- Meganathan, R. 2001. 'Ubiquinone biosynthesis in microorganisms', *FEMS Microbiology Letters*, 203: 131-9.
- Mukai, N., K. Masaki, T. Fujii, M. Kawamukai, and H. Iefuji. 2010. 'PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109: 564-69.
- Nakahigashi, K., K. Miyamoto, K. Nishimura, and H. Inokuchi. 1992. 'Isolation and characterization of a light-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone', *Journal of Bacteriology*, 174: 7352-9.
- Naoko Fujimoto, Tomoyuki Kosaka, and Mamoru Yamada. 2012. 'Menaquinone as Well as Ubiquinone as a Crucial Component in the *Escherichia coli* Respiratory Chain.' in Deniz Ekinici (ed.), *Chemical Biology*.
- Nichols, R. J., S. Sen, Y. J. Choo, P. Beltrao, M. Zietek, R. Chaba, S. Lee, K. M. Kazmierczak, K. J. Lee, A. Wong, M. Shales, S. Lovett, M. E. Winkler, N. J. Krogan, A. Typas, and C. A. Gross. 2011. 'Phenotypic landscape of a bacterial cell', *Cell*, 144: 143-56.
- Nowicka, B., and J. Kruk. 2010. 'Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797: 1587-605.
- Okada, K., T. Kainou, H. Matsuda, and M. Kawamukai. 1998. 'Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS Letters*, 431: 241-4.
- Okada, K., M. Minehira, X. Zhu, K. Suzuki, T. Nakagawa, H. Matsuda, and M. Kawamukai. 1997. 'The ispB gene encoding octaprenyl diphosphate synthase is essential for growth of *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 179: 3058-60.
- Ozeir, M., U. Muhlenhoff, H. Weber, R. Lill, M. Fontecave, and F. Pierrel. 2011. 'Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency', *Chemistry & Biology*, 18: 1134-42.
- Palffy, B. A., B. Entsch, D. P. Ballou, and V. Massey. 1994. 'Changes in the catalytic properties of p-hydroxybenzoate hydroxylase caused by the mutation Asn300Asp', *Biochemistry*, 33: 1545-54.
- Palffy, B. A., and C. A. McDonald. 2010. 'Control of catalysis in flavin-dependent monooxygenases', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 493: 26-36.
- Pan, J. Y., H. Wu, X. Liu, P. P. Li, H. Li, S. Y. Wang, and X. X. Peng. 2011. 'Complexome of *Escherichia coli* cytosolic proteins under normal native conditions', *Molecular BioSystems*, 7: 2651-63.
- Papa, S., and V. P. Skulachev. 1997. 'Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 174: 305-19.
- Papanastasiou, M., G. Orfanoudaki, M. Koukaki, N. Kountourakis, M. F. Sardis, M. Aivaliotis, S. Karamanou, and A. Economou. 2013. 'The *Escherichia coli* peripheral inner membrane proteome', *Molecular and Cellular Proteomics*, 12: 599-610.
- Papucci, L., N. Schiavone, E. Witort, M. Donnini, A. Lapucci, A. Tempestini, L. Formigli, S. Zecchi-Orlandini, G. Orlandini, G. Carella, R. Brancato, and S. Capaccioli. 2003. 'Coenzyme Q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 28220-28.
- Park, Y. C., S. J. Kim, J. H. Choi, W. H. Lee, K. M. Park, M. Kawamukai, Y. W. Ryu, and J. H. Seo. 2005. 'Batch and fed-batch production of coenzyme Q10 in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 192-6.
- Pierrel, F., O. Hamelin, T. Douki, S. Kieffer-Jaquinod, U. Muhlenhoff, M. Ozeir, R. Lill, and M. Fontecave. 2010. 'Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis', *Chemistry & Biology*, 17: 449-59.
- Poon, W. W., R. J. Barkovich, A. Y. Hsu, A. Frankel, P. T. Lee, J. N. Shepherd, D. C. Myles, and C. F. Clarke. 1999. 'Yeast and rat Coq3 and *Escherichia coli* UbiG polypeptides catalyze both O-

- methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 21665-72.
- Poon, W. W., D. E. Davis, H. T. Ha, T. Jonassen, P. N. Rather, and C. F. Clarke. 2000. 'Identification of *Escherichia coli* ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis', *Journal of Bacteriology*, 182: 5139-46.
- Potter, L. C., and J. A. Cole. 1999. 'Essential roles for the products of the napABCD genes, but not napFGH, in periplasmic nitrate reduction by *Escherichia coli* K-12', *Biochemical Journal*, 344 Pt 1: 69-76.
- Quinzii, C. M., V. Emmanuele, and M. Hirano. 2014. 'Clinical presentations of coenzyme q10 deficiency syndrome', *Mol Syndromol*, 5: 141-6.
- Quinzii, C. M., and M. Hirano. 2010. 'Coenzyme Q and mitochondrial disease', *Dev Disabil Res Rev*, 16: 183-8.
- Rangarajan, E. S., Y. Li, P. Iannuzzi, A. Tocilj, L. W. Hung, A. Matte, and M. Cygler. 2004. 'Crystal structure of a dodecameric FMN-dependent UbiX-like decarboxylase (Pad1) from *Escherichia coli* O157: H7', *Protein Science*, 13: 3006-16.
- Rea, S. L., B. H. Graham, E. Nakamaru-Ogiso, A. Kar, and M. J. Falk. 2010. 'Bacteria, yeast, worms, and flies: exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases', *Dev. Disabil. Res. Rev.*, 16: 200-18.
- Rendon, J., E. Pilet, Z. Fahs, F. Seduk, L. Sylvi, M. Hajj Chehade, F. Pierrel, B. Guigliarelli, A. Magalon, and S. Grimaldi. 2015. 'Demethylmenaquinol is a substrate of *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI) and forms a stable semiquinone intermediate at the NarGHI quinol oxidation site', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847: 739-47.
- Rohmer, M. 1999. 'The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants', *Natural Product Reports*, 16: 565-74.
- Salmon, K., S. P. Hung, K. Mekjian, P. Baldi, G. W. Hatfield, and R. P. Gunsalus. 2003. 'Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 29837-55.
- Schmelzer, C., I. Lindner, C. Vock, K. Fujii, and F. Doring. 2007. 'Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study', *IUBMB Life*, 59: 628-33.
- Schoepp-Cothenet, B., R. van Lis, A. Atteia, F. Baymann, L. Capowiez, A. L. Ducluzeau, S. Duval, F. ten Brink, M. J. Russell, and W. Nitschke. 2013. 'On the universal core of bioenergetics', *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1827: 79-93.
- Schreuder, H. A., A. Mattevi, G. Obmolova, K. H. Kalk, W. G. Hol, F. J. van der Bolt, and W. J. van Berkel. 1994. 'Crystal structures of wild-type p-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with 4-aminobenzoate, 2,4-dihydroxybenzoate, and 2-hydroxy-4-aminobenzoate and of the Tyr222Ala mutant complexed with 2-hydroxy-4-aminobenzoate. Evidence for a proton channel and a new binding mode of the flavin ring', *Biochemistry*, 33: 10161-70.
- Sevin, D. C., and U. Sauer. 2014. 'Ubiquinone accumulation improves osmotic-stress tolerance in *Escherichia coli*', *Nature Chemical Biology*, 10: 266-72.
- Sharma, P., M. J. Teixeira de Mattos, K. J. Hellingwerf, and M. Bekker. 2012. 'On the function of the various quinone species in *Escherichia coli*', *FEBS Journal*, 279: 3364-73.
- Sherman, F. 2002. 'Getting started with yeast', *Methods in Enzymology*, 350: 3-41.
- Shestopalov, A. I., A. V. Bogachev, R. A. Murtazina, M. B. Viryasov, and V. P. Skulachev. 1997. 'Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*. Evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis', *FEBS Letters*, 404: 272-4.
- Siebert, M., K. Severin, and L. Heide. 1994. 'Formation of 4-hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: characterization of the ubiC gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase', *Microbiology*, 140 (Pt 4): 897-904.
- Smith, N., A. E. Roitberg, E. Rivera, A. Howard, M. J. Holden, M. Mayhew, S. Kaistha, and D. T. Gallagher. 2006. 'Structural analysis of ligand binding and catalysis in chorismate lyase', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445: 72-80.

- Soballe, B., and R. K. Poole. 1999. 'Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management', *Microbiology-Uk*, 145: 1817-30.
- Song, H. K., J. Y. Lee, M. G. Lee, J. Moon, K. Min, J. K. Yang, and S. W. Suh. 1999. 'Insights into eukaryotic multistep phosphorelay signal transduction revealed by the crystal structure of Ypd1p from *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Molecular Biology*, 293: 753-61.
- Stefely, J. A., A. G. Reidenbach, A. Ulbrich, K. Oruganty, B. J. Floyd, A. Jochem, J. M. Saunders, I. E. Johnson, C. E. Minogue, R. L. Wrobel, G. E. Barber, D. Lee, S. Li, N. Kannan, J. J. Coon, C. A. Bingman, and D. J. Pagliarini. 2014. 'Mitochondrial ADCK3 Employs an Atypical Protein Kinase-like Fold to Enable Coenzyme Q Biosynthesis', *Molecular Cell*.
- Stenberg, F., P. Chovanec, S. L. Maslen, C. V. Robinson, L. L. Ilag, G. von Heijne, and D. O. Daley. 2005. 'Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 34409-19.
- Stenmark, P., J. Grunler, J. Mattsson, P. J. Sindelar, P. Nordlund, and D. A. Berthold. 2001. 'A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 33297-300.
- Stroobant, P., I. G. Young, and F. Gibson. 1972. 'Mutants of *Escherichia coli* K-12 blocked in the final reaction of ubiquinone biosynthesis: characterization and genetic analysis', *Journal of Bacteriology*, 109: 134-9.
- Suzuki, K., M. Ueda, M. Yuasa, T. Nakagawa, M. Kawamukai, and H. Matsuda. 1994. 'Evidence that *Escherichia coli* ubiA product is a functional homolog of yeast COQ2, and the regulation of ubiA gene expression', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58: 1814-9.
- Takahashi, S., Y. Ogiyama, H. Kusano, H. Shimada, M. Kawamukai, and K. Kadowaki. 2006. 'Metabolic engineering of coenzyme Q by modification of isoprenoid side chain in plant.', *FEBS Letters*, 580: 955-9.
- Takahashi, Y. H., K. Inaba, and K. Ito. 2004. 'Characterization of the menaquinone-dependent disulfide bond formation pathway of *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 47057-65.
- Tran, Q. H., J. Bongaerts, D. Vlad, and G. Unden. 1997. 'Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications', *European Journal of Biochemistry*, 244: 155-60.
- Tran, U. C., and C. F. Clarke. 2007. 'Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes', *Mitochondrion*, 7: S62-71.
- Tran, U. C., B. Marbois, P. Gin, M. Gulmezian, T. Jonassen, and C. F. Clarke. 2006. 'Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 mutants by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiF polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 16401-9.
- Trumpower, B. L. 1976. 'Evidence for a protonmotive Q cycle mechanism of electron transfer through the cytochrome b-c1 complex', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 70: 73-80.
- Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner. 2004. 'Metabolism and function of coenzyme Q', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660: 171-99.
- Unden, G., and J. Bongaerts. 1997. 'Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1320: 217-34.
- Unden, G., and J. Schirawski. 1997. 'The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions', *Molecular Microbiology*, 25: 205-10.
- Vidgren, J., L. A. Svensson, and A. Liljas. 1994. 'Crystal structure of catechol O-methyltransferase', *Nature*, 368: 354-8.
- Vogt, C., S. Kleinsteuber, and H. H. Richnow. 2011. 'Anaerobic benzene degradation by bacteria', *Microb Biotechnol*, 4: 710-24.
- Wallace, B. J., and I. G. Young. 1977a. 'Aerobic respiration in mutants of *Escherichia coli* accumulating quinone analogues of ubiquinone', *Biochimica et Biophysica Acta*, 461: 75-83.

- . 1977b. 'Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a ubiA- menA- double quinone mutant', *Biochimica et Biophysica Acta*, 461: 84-100.
- Wessjohann, L., and B. Sontag. 1996. 'Prenylation of benzoic acid derivatives catalyzed by a transferase from *Escherichia coli* overproduction: Method development and substrate specificity', *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 35: 1697-99.
- White, M. D., K. A. Payne, K. Fisher, S. A. Marshall, D. Parker, N. J. Rattray, D. K. Trivedi, R. Goodacre, S. E. Rigby, N. S. Scrutton, S. Hay, and D. Leys. 2015. 'UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis', *Nature*, 522: 502-6.
- Williams SM, Savery NJ, Busby SJ, Wing HJ. . 1997. 'Transcription activation at a class I FNR-dependent promoters: identification of the activating surface of FNR and the corresponding contact site in the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit.', *Nucleic Acid Res.*, 25.
- Wissenbach, U., A. Kroger, and G. Uden. 1990. 'THE SPECIFIC FUNCTIONS OF MENAQUINONE AND DEMETHYLMENAQUINONE IN ANAEROBIC RESPIRATION WITH FUMARATE, DIMETHYLSULFOXIDE, TRIMETHYLAMINE N-OXIDE AND NITRATE BY *ESCHERICHIA-COLI*', *Archives of Microbiology*, 154: 60-66.
- Wissenbach, U., D. Ternes, and G. Uden. 1992. 'An *Escherichia coli* mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration', *Archives of Microbiology*, 158: 68-73.
- Wittig, I., H. P. Braun, and H. Schagger. 2006. 'Blue native PAGE', *Nature Protocols*, 1: 418-28.
- Wu, G., H. D. Williams, M. Zamanian, F. Gibson, and R. K. Poole. 1992. 'Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants affected in aerobic respiration: the cloning and nucleotide sequence of ubiG. Identification of an S-adenosylmethionine-binding motif in protein, RNA, and small-molecule methyltransferases', *Journal of General Microbiology*, 138: 2101-12.
- Wu, H., G. N. Bennett, and K. Y. San. 2015. 'Metabolic control of respiratory levels in coenzyme Q biosynthesis-deficient *Escherichia coli* strains leading to fine-tune aerobic lactate fermentation', *Biotechnology and Bioengineering*.
- Xie, L. X., E. J. Hsieh, S. Watanabe, C. M. Allan, J. Y. Chen, U. C. Tran, and C. F. Clarke. 2011. 'Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast *coq8* mutants', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811: 348-60.
- Xie, L. X., M. Ozeir, J. Y. Tang, J. Y. Chen, S. Kieffer-Jaquinod, M. Fontecave, C. F. Clarke, and F. Pierrel. 2012. 'Over-expression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the Coenzyme Q6 biosynthetic pathway', *Journal of Biological Chemistry*, 287: 23571-81.
- Xie, L. X., K. J. Williams, C. H. He, E. Weng, S. Khong, T. E. Rose, O. Kwon, S. J. Bensinger, B. N. Marbois, and C. F. Clarke. 2015. 'Resveratrol and para-coumarate serve as ring precursors for coenzyme Q biosynthesis', *Journal of Lipid Research*.
- Xu, W., S. Yang, J. Zhao, T. Su, L. Zhao, and J. Liu. 2014. 'Improving coenzyme Q8 production in *Escherichia coli* employing multiple strategies', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41: 1297-303.
- Yap, L. L., M. T. Lin, H. Ouyang, R. I. Samoilova, S. A. Dikanov, and R. B. Gennis. 2010. 'The quinone-binding sites of the cytochrome bo3 ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797: 1924-32.
- Young, I. G., R. A. Leppik, J. A. Hamilton, and F. Gibson. 1972. 'Biochemical and genetic studies on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12:4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase', *Journal of Bacteriology*, 110: 18-25.
- Young, I. G., L. M. McCann, Strooban.P, and F. Gibson. 1971. 'CHARACTERIZATION AND GENETIC ANALYSIS OF MUTANT STRAINS OF *ESCHERICHIA-COLI* K-12 ACCUMULATING UBIQUINONE PRECURSORS 2-OCTAPRENYL-6-METHOXY-1,4-BENZOQUINONE AND 2-OCTAPRENYL-3-METHYL-6-METHOXY-1,4-BENZOQUINONE', *Journal of Bacteriology*, 105: 769-&.
- Young, I. G., P. Stroobant, C. G. Macdonald, and F. Gibson. 1973. 'Pathway for ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: gene-enzyme relationships and intermediates', *Journal of Bacteriology*, 114: 42-52.

Références bibliographiques

- Zahiri, H. S., S. H. Yoon, J. D. Keasling, S. H. Lee, S. Won Kim, S. C. Yoon, and Y. C. Shin. 2006. 'Coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway', *Metabolic Engineering*, 8: 406-16.
- Zhang, H., and G. T. Javor. 2003. 'Regulation of the isofunctional genes *ubiD* and *ubiX* of the ubiquinone biosynthetic pathway of *Escherichia coli*', *FEMS Microbiology Letters*, 223: 67-72.
- Zhang, T., P. L. Tremblay, A. K. Chaurasia, J. A. Smith, T. S. Bain, and D. R. Lovley. 2013. 'Anaerobic benzene oxidation via phenol in *Geobacter metallireducens*', *Appl Environ Microbiol*, 79: 7800-6.
- Zhou, L., T. W. Huang, J. Y. Wang, S. Sun, G. Chen, A. Poplawsky, and Y. W. He. 2013. 'The rice bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces 3-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid via *XanB2* for use in xanthomonadin, ubiquinone, and exopolysaccharide biosynthesis', *Mol Plant Microbe Interact*, 26: 1239-48.

Annexe 1 : Figures supplémentaires de l'article UbiI

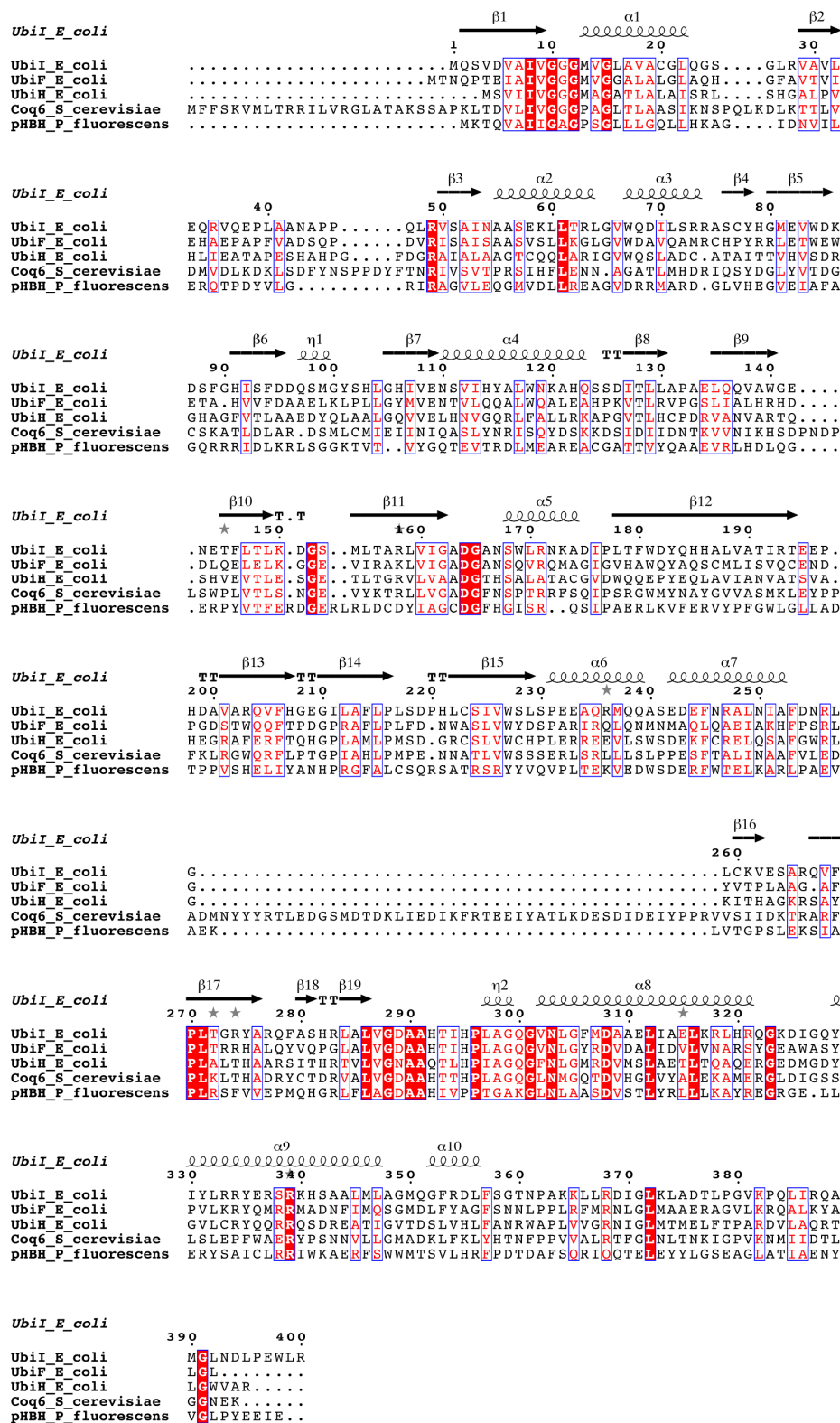


Figure S1: Sequence alignment of the three flavin monooxygenases involved in Q biosynthesis in *E. coli* K12 (UbiI, YP491107, UbiF, YP488953, and UbiH, YP491108), Coq6 from *Saccharomyces cerevisiae* (AAB61341) and the para-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH, P00438) from *Pseudomonas aeruginosa*. Sequences were aligned using ClustalW2, and rendered with ESPrnt 2.2 (<http://esprnt.ibcp.fr/ESPrnt/ESPrnt/>). Secondary structure elements are shown above the sequence. Identical amino acids are coloured in red.

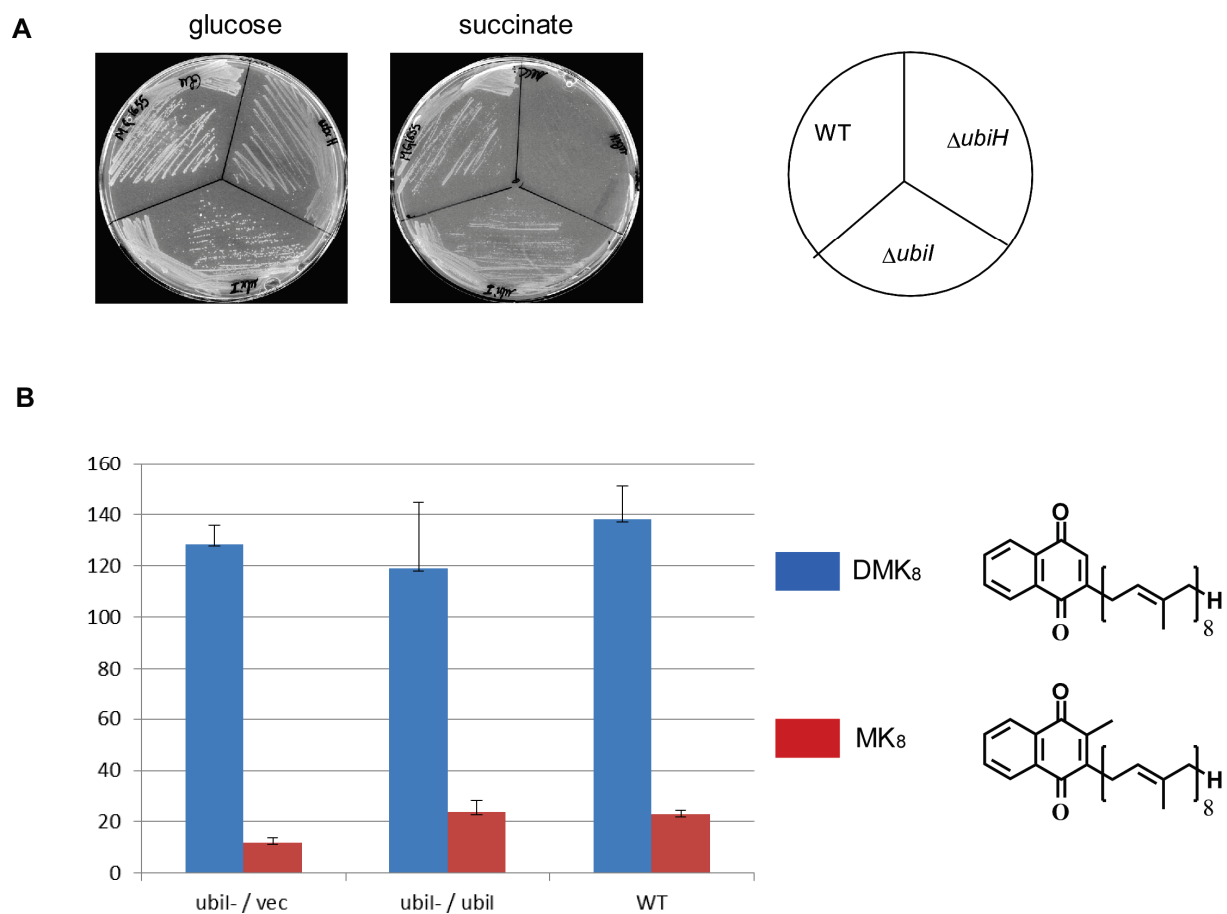


Figure S2: Growth of Δubi cells and levels of isoprenoid naphthoquinones. A) WT, $\Delta ubiH$ and $\Delta ubiI$ cells were streaked on M9-glucose and M9-succinate medium and incubated at 37°C for 1 day. B) Quantification (units of absorbance at 210nm/ mg wet weight) of cellular DMK₈ and MK₈ content of cells described in figure 2A. Error bars are standard deviation.

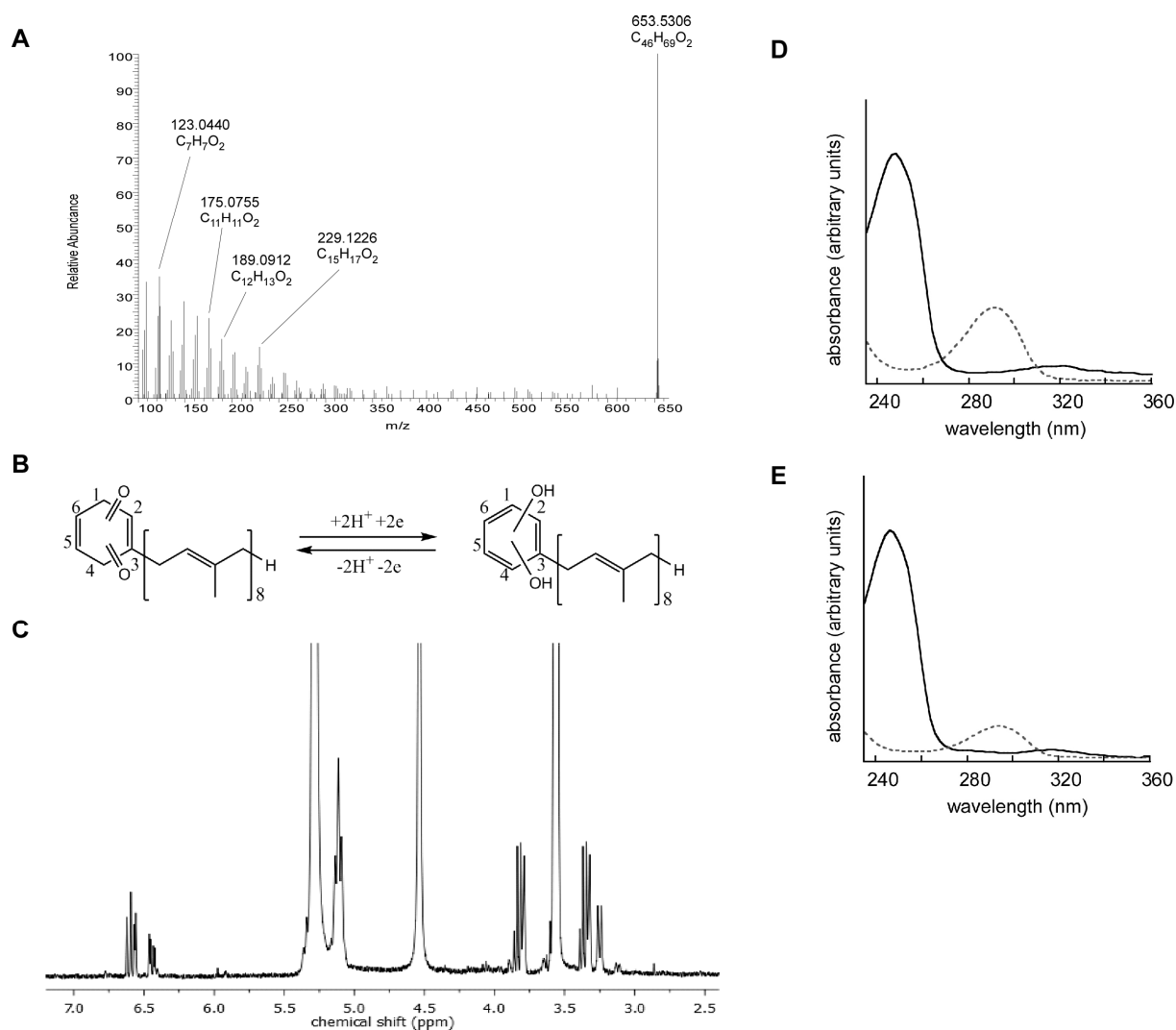


Figure S3: A) fragmentation mass spectrum of the 653.5 molecular ion. B) Chemical structures of the $C_{46}H_{70}O_2$ and $C_{46}H_{68}O_2$ molecules. C) 1H NMR spectrum of the purified $C_{46}H_{70}O_2$ molecule in D_6 -ethanol. D) UV spectra of reduced (dashed line) and oxidized (solid line) compound X. E) UV spectra of 2-methyl-4-hydroxyphenol (dashed line) and of its oxidized form 2-methyl-4-benzoquinone (solid line).

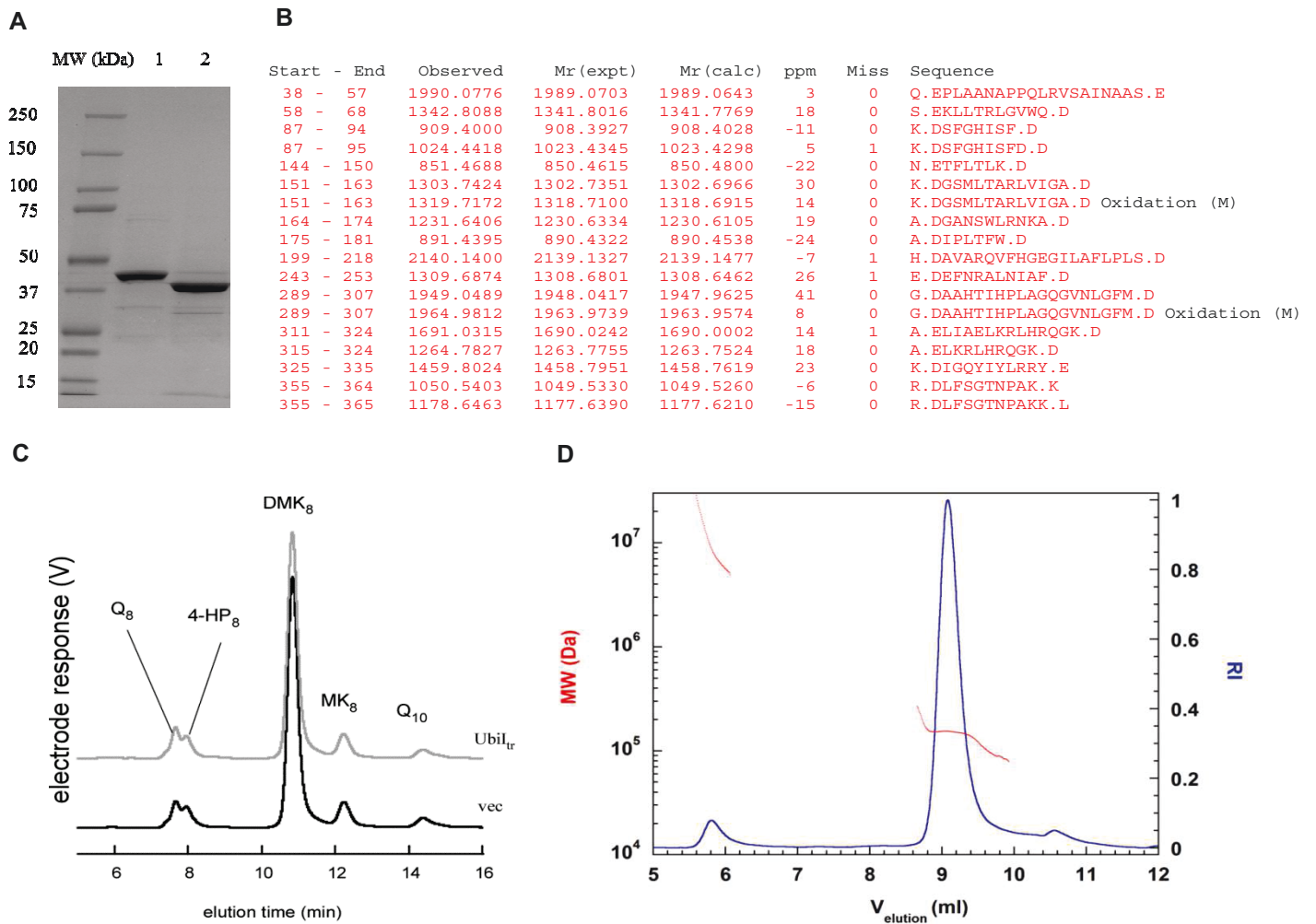


Figure S4: A) SDS-PAGE of the full length UbiI-his₆ and its truncated form. Molecular weights, kDa. Lane 1, 10 μ g UbiI-his₆, lane 2, 10 μ g truncated form of UbiI-his₆. B) Peptide mass fingerprint (MALDI-TOF) of the truncated form of UbiI-his₆ after AspN digestion. C) HPLC-ECD of lipid extracts from 2mg of Δ ubiI cells containing an empty vector (in black) or pTrc-ubiI_{tr} (in grey) grown in aerobic conditions. D) SEC-MALLS elution profiles in 25 mM Tris-HCl, pH 7.3, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol of UbiI_{tr} at 4 mg/ml. The MALLS/RI analysis yields a measured mass of 154 kDa for the main peak consistent with a tetramer.

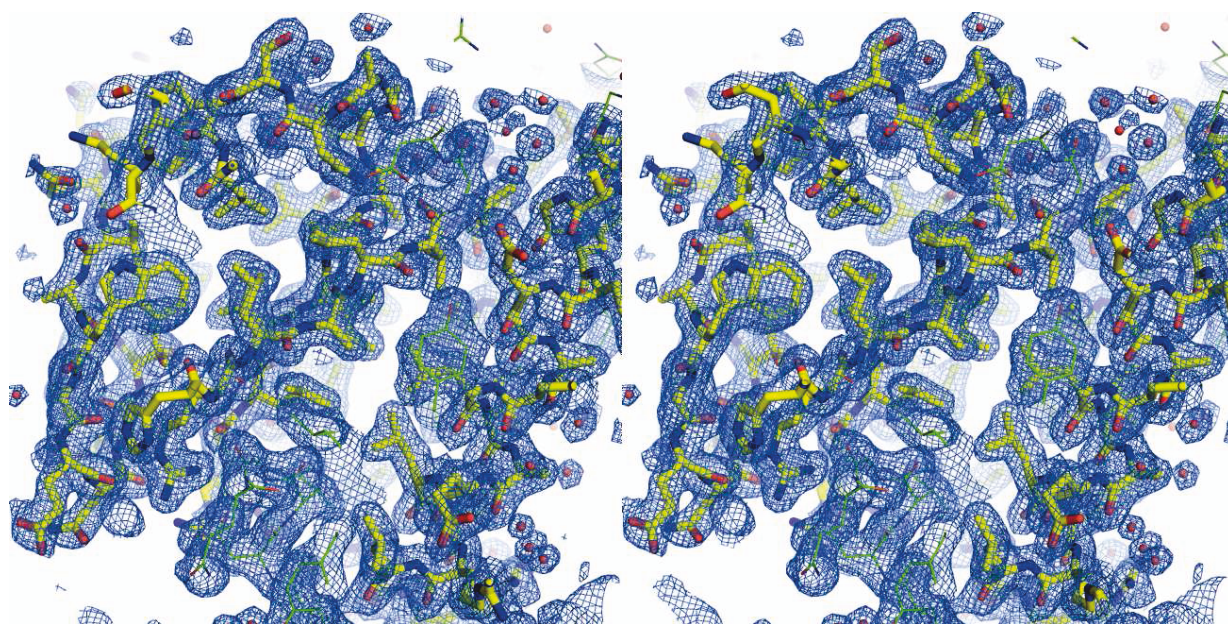


Figure S5: Stereoscopic view of a section of the $2F_0-F_C$ electron density map centered on the Rossman-like fold and contoured at the 1σ level. Residues in yellow belong to the Rossman-like fold, residues in green belong to the same chain but are not part of the Rossman fold.

Annexe 2 : Article UbiJ

ubiJ, a New Gene Required for Aerobic Growth and Proliferation in Macrophage, Is Involved in Coenzyme Q Biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Laurent Aussel,^a Laurent Loiseau,^a Mahmoud Hajj Chehade,^b Bérengère Pocachard,^a Marc Fontecave,^c Fabien Pierrel,^b Frédéric Barras^a

Laboratoire de Chimie Bactérienne, UMR 7283, Aix-Marseille Université—CNRS, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille, France^a; Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR 5249, CEA—Université Grenoble I, CNRS, Grenoble, France^b; Collège de France, Paris, France^c

Ubiquinone (coenzyme Q or Q₈) is a redox active lipid which functions in the respiratory electron transport chain and plays a crucial role in energy-generating processes. In both *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the *yigP* gene is located between *ubiE* and *ubiB*, all three being likely to constitute an operon. In this work, we showed that the uncharacterized *yigP* gene was involved in Q₈ biosynthesis in both strains, and we have renamed it *ubiJ*. Under aerobic conditions, an *ubiJ* mutant was found to be impaired for Q₈ biosynthesis and for growth in rich medium but did not present any defect anaerobically. Surprisingly, the C-terminal 50 amino acids, predicted to interact with lipids, were sufficient to restore Q₈ biosynthesis and growth of the *ubiJ* mutant. *Salmonella ubiE* and *ubiB* mutants were impaired in Q₈ biosynthesis and in respiration using different electron acceptors. Moreover, *ubiE*, *ubiJ*, and *ubiB* mutants were all impaired for *Salmonella* intracellular proliferation in macrophages. Taken together, our data establish an important role for UbiJ in Q₈ biosynthesis and reveal an unexpected link between Q₈ and virulence. They also emphasize that *Salmonella* organisms in an intracellular lifestyle rely on aerobic respiration to survive and proliferate within macrophages.

Ubiquinone, also known as coenzyme Q, is a lipid component found in organisms ranging from bacteria to mammals. It consists of a conserved quinone head group and an isoprenoid hydrophobic tail, the length of which differs among species (1). In *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the tail of coenzyme Q has eight isoprene groups and is designated Q₈. This molecule is located in the bacterial plasma membrane and serves as an electron carrier between electron donors, such as NADH dehydrogenase (complex I), succinate dehydrogenase (complex II), or lactate dehydrogenase, and terminal electron acceptors, such as cytochrome oxidases or reductases (2, 3). Thus, Q₈ is an essential element for aerobic respiratory growth and for a series of processes depending upon a functional proton motive force, such as nutrient import, cell motility, and protein secretion (4–7). Moreover, mutants affected in Q₈ biosynthesis were shown to be hypersensitive to H₂O₂, as the production rate of O₂^{•−} and H₂O₂ in their membranes was significantly higher than that in a wild-type strain (8).

Biosynthesis of coenzyme Q has been studied for many years in both *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Besides the prenyltransferase UbiA and the decarboxylases UbiX and UbiD, two types of enzymes, monooxygenases and methyltransferases, catalyze chemical modifications of the aromatic ring of the 4-hydroxybenzoic acid (4-HB) universal precursor (Fig. 1). Beyond this seemingly well-established pathway, uncertainties remain. For instance, UbiB was described as being involved in the C-5 hydroxylation reaction, but we recently demonstrated that this step was catalyzed by UbiI, a new monooxygenase formally known as VisC (9). The function of UbiB remains unclear, although some circumstantial evidence suggests that it might act as a kinase (10, 11). Other monooxygenases include UbiF and UbiH (Fig. 1) (12, 13). Also, *ubiF*, *ubiH*, and *ubiI* mutants do not synthesize Q₈ under aerobic growth conditions but produce appreciable amounts

of Q₈ anaerobically (9, 14, 15). This indicates that an anaerobic biosynthetic pathway exists for which we have no clues as to which genes are involved. Methyltransferases include UbiE and UbiG (Fig. 1) (16–18). UbiE is required for the C methylation reactions in both Q₈ and menaquinone (MK₈) biosynthesis, and an *ubiE* mutant synthesizes neither Q₈ nor MK₈ (6, 17, 19). The *ubiE* gene is predicted to be part of an operon including the *ubiB* gene and the *yigP* gene, whose function is unknown (20). In *Salmonella*, a transposon-based mutagenesis screen identified *yigP* as an essential gene (21). Recently, *yigP* was also proposed to be essential in *E. coli* (22). Curiously, in this case, the *yigP* gene was proposed to encode, within its 3′ moiety, a small RNA of 252 nucleotides which exhibits an essential function of unknown nature (22). This predicted small RNA was named *esre*, for “essential small RNA in *E. coli*.”

In the present study, we focused on the predicted *ubiE-yigP-ubiB* operon, in both *Salmonella* and *E. coli*. Derivatives lacking a functional *yigP* gene could be constructed in both strains, ruling out the hypothesis of an essential role. Moreover, we found the *yigP* gene to be required for Q₈ biosynthesis under aerobic conditions, and we changed the name of *YigP* to UbiJ. Evidence that the role of *ubiJ* in Q₈ biosynthesis was carried out by the UbiJ poly-

Received 11 September 2013 Accepted 11 October 2013

Published ahead of print 18 October 2013

Address correspondence to Frédéric Barras, barras@imm.cnrs.fr.

L.A. and L.L. contributed equally to this work.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01065-13>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.01065-13

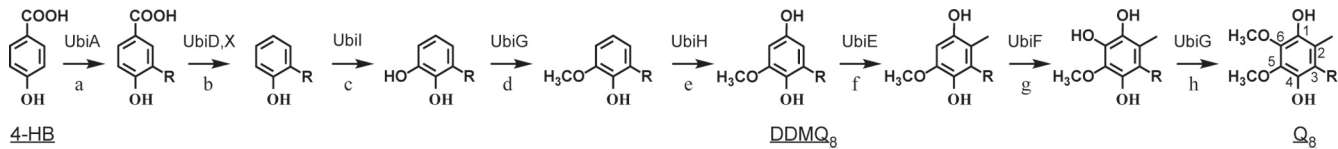


FIG 1 Biosynthetic pathway of coenzyme Q₈ in *Escherichia coli*. The octaprenyl tail is represented by R on carbon 3 of the different biosynthetic intermediates. The names of the enzymes catalyzing the reactions (each labeled with a lowercase letter) are provided. 4-HB, 4-hydroxybenzoic acid; DDMQ₈, C-1-demethyl-C-6-demethoxy-Q₈; Q₈, coenzyme Q₈.

peptide and not by a putative small RNA was collected. Finally, we showed that UbiE, UbiJ, and UbiB were required for *Salmonella* intracellular proliferation in macrophages, establishing a link between Q₈ biosynthesis and bacterial virulence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains used in this study are described in Table 1, and primers are listed in Table S1 in the supplemental material. Strains were routinely grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) or M9-based minimal medium. For growth studies, overnight cultures were diluted into medium of the same composition to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.05. Growth under anaerobiosis was achieved by using the GENbox Anaer generator (bioMérieux) in a dedicated chamber. Ampicillin (50 µg/ml) and kanamycin (25 µg/ml) were added when necessary. Arabinose, glucose, and glycerol were used at

0.2%. Fumarate (20 mM), nitrate (2 mM), and trimethyl amine oxide (TMAO) (20 mM) were used as electron acceptors. Deletion of various genes and concomitant insertion of an antibiotic resistance cassette was carried out using lambda Red-mediated recombination (23). Mutations were moved to the wild-type *S. Typhimurium* strain 12023 by P22 transductions and to the wild-type *E. coli* strain MG1655 by P1 transductions.

Plasmid construction. The cloning vector used was pBAD24 (24). The inserts carrying *ubiJ* variants, *ubiE*, and *ubiB* were PCR amplified from *S. Typhimurium* 12023 by using the primers described in Table S1 in the supplemental material. PCR products were digested using XbaI and NcoI and cloned into pBAD24. The coding sequences of the *E. coli ubiJ* gene were PCR amplified from an MG1655 strain by using the primers described in Table S1, digested using EcoRI and SalI, and cloned into pBADI*, yielding *pubiJ*_{E.c.} and *pubiJ* 50C_{E.c.}. *pubiJ* 50C_{E.c.} was digested by EcoRI and HindIII, and the insert carrying the *ubiJ* variant was cloned in

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant genotype ^a	Source or reference
Strains		
<i>S. Typhimurium</i>		
12023	Wild type	Laboratory stock
Δ <i>ubiJ</i> mutant	12023 Δ <i>ubiJ</i> ::Kan	This study
Δ <i>ubiE</i> mutant	12023 Δ <i>ubiE</i> ::Kan	This study
Δ <i>ubiB</i> mutant	12023 Δ <i>ubiB</i> ::Kan	This study
<i>E. coli</i>		
MG1655	Wild type	Laboratory stock
Δ <i>ubiJ</i> mutant	MG1655 Δ <i>ubiJ</i> ::Kan	This study
Plasmids		
pBAD24	Cloning vector (Ap ^r)	24
pTrc99A	Cloning vector (Ap ^r)	Amersham
pBADI*	Cloning vector (Ap ^r)	34
pKD4	Template plasmid containing an FRT-flanked kanamycin resistance	23
pKD46	Red recombinase expression plasmid	23
<i>S. Typhimurium</i>		
<i>pubiJ</i> _{S.t.}	pBAD24 derivative carrying the <i>S. Typhimurium ubiJ</i> gene (Ap ^r)	This study
<i>pubiB</i>	pBAD24 derivative carrying <i>ubiB</i> (Ap ^r)	This study
<i>pubiJ</i> N-ter	pBAD24 derivative carrying the 120 amino acids located in the N terminus of <i>ubiJ</i> (Ap ^r)	This study
<i>pubiJ</i> 63C	pBAD24 derivative carrying the 63 amino acids located in the C terminus of <i>ubiJ</i> (Ap ^r)	This study
<i>pubiJ</i> 50C	pBAD24 derivative carrying the 50 amino acids located in the C terminus of <i>ubiJ</i> (Ap ^r)	This study
<i>pubiJ</i> 50C+1	pBAD24 derivative carrying the 50 amino acids located in the C terminus of <i>ubiJ</i> and a frameshift of one nucleotide after the start codon (Ap ^r)	This study
<i>pubiJ</i> 50C+2	pBAD24 derivative carrying the 50 amino acids located in the C terminus of <i>ubiJ</i> and a frameshift of two nucleotides after the start codon (Ap ^r)	This study
<i>pubiJ</i> 35C	pBAD24 derivative carrying the 35 amino acids located in the C terminus of <i>ubiJ</i> (Ap ^r)	This study
<i>E. coli</i>		
<i>pubiJ</i> _{E.c.}	pBAD24 derivative carrying the <i>E. coli ubiJ</i> gene (Ap ^r)	This study
<i>pubiJ</i> 50C _{E.c.}	pTrc99A derivative carrying the 50 amino acids located in the C terminus of <i>ubiJ</i> (Ap ^r)	This study

^a FRT, Flp recombinase target.

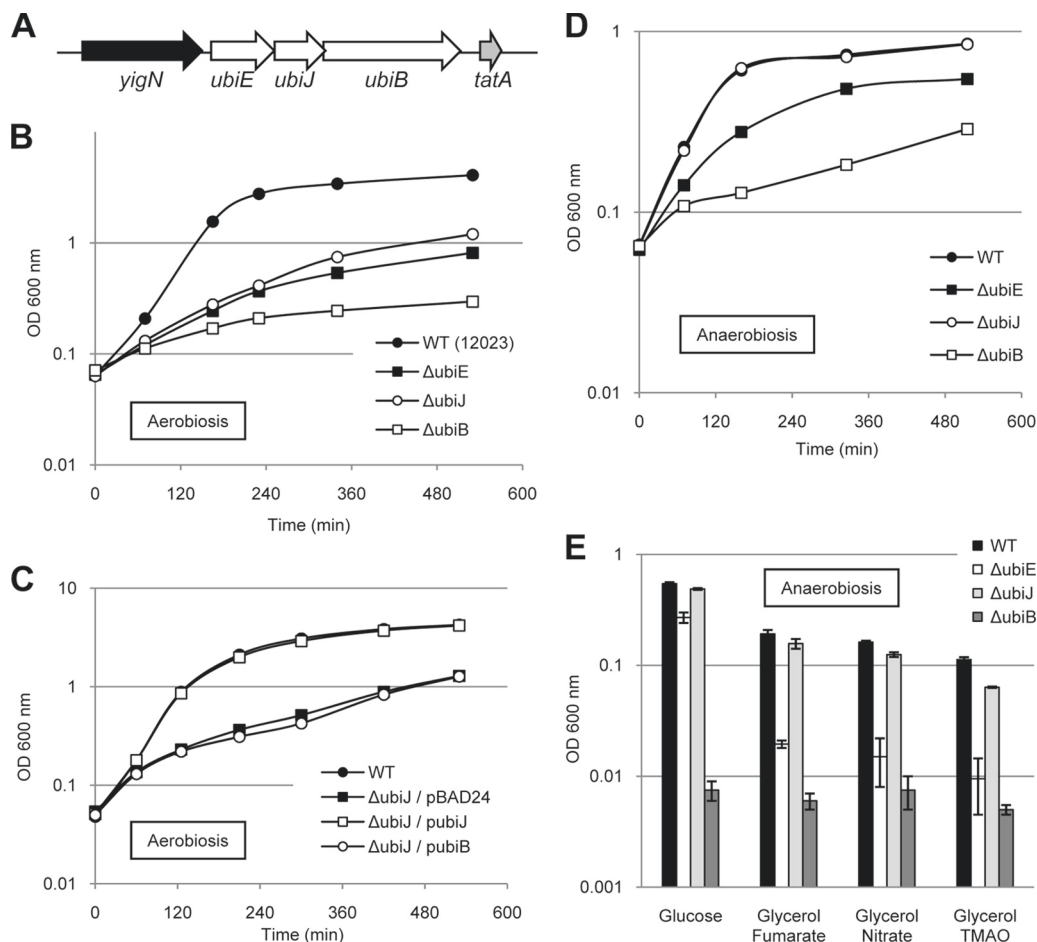


FIG 2 The *ubiJ* mutant exhibited a growth defect under aerobic conditions. (A) Genetic organization of the *ubiE*, *ubiJ*, and *ubiB* loci in *Salmonella Typhimurium*. (B) Wild-type (filled circles), $\Delta ubiE$ (filled squares), $\Delta ubiJ$ (open circles), and $\Delta ubiB$ (open squares) strains were grown overnight and then diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB medium at 37°C under aerobic conditions. Growth was monitored at 600 nm. (C) The wild type (filled circles) and the $\Delta ubiJ$ strain transformed with pBAD24 (filled squares), with *pubiJ* (open squares), and with *pubiB* (open circles) were grown overnight and then diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB under aerobic conditions. Growth was monitored at 600 nm. (D) The strains previously described were grown overnight anaerobically and then diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB under anaerobic conditions. Growth was monitored at 600 nm. (E) Wild-type (black bars), $\Delta ubiE$ (white bars), $\Delta ubiJ$ (light gray bars), and $\Delta ubiB$ (dark gray bars) strains were grown under anaerobiosis in minimal medium supplemented with glucose or glycerol as a carbon source and with nitrate, trimethylamine *N*-oxide (TMAO), or fumarate as an electron acceptor. OD₆₀₀ values were recorded after 16 h of incubation at 37°C. The experiments whose results are shown in panels B, C, and D were performed at least in triplicate. Identical patterns were obtained, and results of a representative experiment are shown. Error bars (E) show standard deviations.

the pTrc99A-6his vector at the same restriction sites. The resulting plasmids were verified by DNA sequencing.

In silico genome analysis. The genome analyzed was that of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (25). BLAST analyses were performed using NPS@ network protein sequence analysis (26). *YigP* (STM3971) was annotated as a putative uncharacterized protein, and we renamed it *UbiJ*.

Quinone extraction and quantification by HPLC-ECD analysis. Five milliliters of cells in exponential phase was centrifuged, and the pellet mass was determined. Glass beads (100 μ l), 50 μ l of 0.15 M KCl, and a volume of a Q₁₀ solution (used as an internal standard) proportional to the wet weight were added to cell pellet. Lipid extraction was performed by adding 0.6 ml of methanol, vortexing for 10 min, adding 0.4 ml of petroleum ether (boiling range, 40°C to 60°C), and vortexing for 3 min. The phases were separated by centrifugation for 1 min at 5,000 rpm. The upper petroleum ether layer was transferred to a fresh tube. Petroleum ether (0.4 ml) was added to the glass beads and methanol-containing tube, and the extraction was repeated. The petroleum ether layers were combined and dried under nitrogen. The dried samples were stored at -20°C and were

resuspended in 100 μ l of 98% ethanol, 20 mM lithium perchlorate. Aliquots were analyzed by reversed-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) with a C₁₈ column (Betabasic-18; 5 mm, 4.6 by 150 mm; Thermo Scientific) at a flow rate of 1 ml/min using 40% ethanol, 40% acetonitrile, and 20% of a mix of 90% isopropanol and 10% lithium perchlorate (1 M) as a mobile phase. Quinones were quantified with an ESA Coulochem III electrochemical detector (ECD) and a 5011A analytical cell (E1, -600 mV; E2, 600 mV). Hydroquinones present in samples were oxidized with a precolumn 5020 guard cell set in oxidizing mode (E, +650 mV). Different volumes of the standard Q₁₀ solution were injected under the same conditions to generate a standard curve which was used for Q₈ quantification. The signal of the absorbance at 210 nm was used to estimate the content in DMK₈ and MK₈ by integrating the respective peaks. Possible sample loss during the organic extraction was corrected on the basis of the recovery of the Q₁₀ internal standard.

Western blot analysis. *pubiJ*, *pubiJ* 50C, *pubiJ* 50C+1, and *pubiJ* 50C+2 carrying a His₆ tag at the C terminus were transformed in a MG1655 *E. coli* strain. The resulting strains were grown in LB until an OD₆₀₀ of 4 was reached and then diluted 1:100 in LB supplemented with

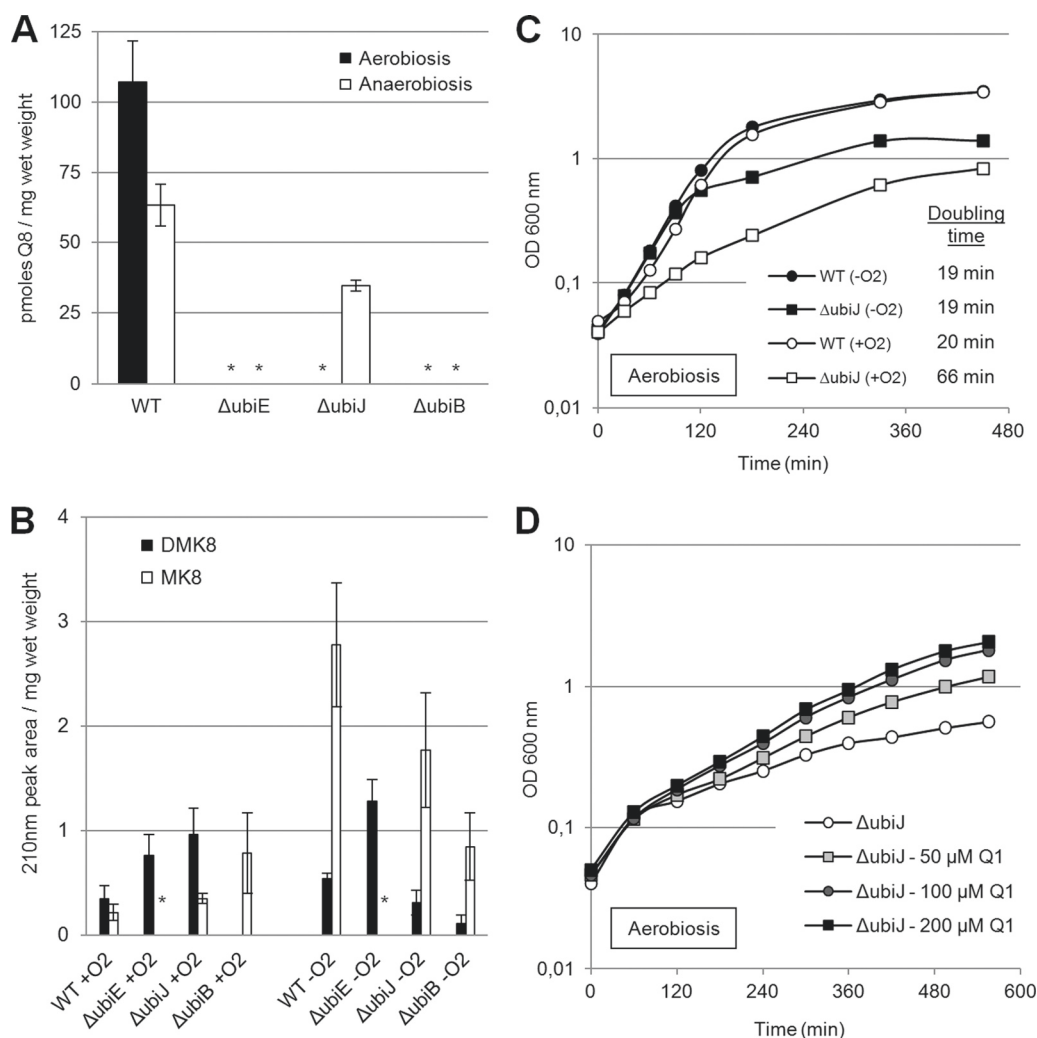


FIG 3 *UbiJ* is required for Q_8 biosynthesis under aerobiosis. (A) Quantification of cellular Q_8 content in lipid extracts from WT, $\Delta ubiE$, $\Delta ubiJ$, and $\Delta ubiB$ cells grown under aerobiosis (black bars) or anaerobiosis (white bars). Error bars show standard deviations. *, not detected. (B) Demethylmenaquinone (DMK₈, black bars) and menaquinone (MK₈, white bars) content in lipid extracts from WT, $\Delta ubiE$, $\Delta ubiJ$, and $\Delta ubiB$ cells grown under aerobiosis (+O₂, left) or anaerobiosis (−O₂, right). Error bars show standard deviations. *, not detected. (C) The wild type (circles) and the *ubiJ* mutant (squares) were grown overnight under either aerobic (open symbols, +O₂) or anaerobic (filled symbols, −O₂) conditions. The cultures were then diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB under aerobic conditions. Growth was monitored at 600 nm, and the doubling time was calculated during the exponential phase. (D) The *ubiJ* mutant was grown overnight aerobically and diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB. Different amounts of coenzyme Q₁ were added at time zero, and growth was monitored at 600 nm. The experiments whose results are presented in panels C and D were performed in triplicate. Similar patterns were obtained, and results of a representative experiment are shown.

0.02% arabinose. The cultures were incubated 4 h at 37°C. Cells were harvested, and the pellet was washed twice. The supernatant was removed and the pellet resuspended in SDS buffer (TS-TD). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using Bio-Rad Miniprotein II cells. Proteins were electrotransferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) sheet (Millipore) and probed with HisProbe-HRP (Thermo Scientific). Blots were visualized with an enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Thermo Scientific).

Bacterial infection of macrophages. RAW 264.7 macrophages were seeded at a density of 4×10^5 cells per well in 6-well tissue culture plates containing Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS) (HyClone). Bacteria were cultured overnight at 37°C with shaking and opsonized in DMEM containing FCS and normal mouse serum (10%; Perbio) for 30 min. Bacteria were added to the monolayers at a multiplicity of infection of 10:1, centrifuged at $400 \times g$ for 5 min at 4°C, and incubated for 30 min at 37°C in 5% CO₂. The macrophages were washed three times and incubated with DMEM containing FCS and 100

μg/ml gentamicin for 60 min, after which the gentamicin concentration was decreased to 10 μg/ml for the remainder of the experiment.

RESULTS

The *ubiJ* gene is required for *Salmonella* aerobic growth. In *E. coli*, the genetic organization of the *ubiE*, *ubiI*, and *ubiB* loci was proposed to form an operon (Fig. 2A) (20). In *S. Typhimurium*, this cluster of genes shares 81.5% sequence identity with that in *E. coli*. Thus, we constructed *ubiE*, *ubiJ*, and *ubiB* deletion mutants in *Salmonella*. During aerobic growth in LB at 37°C, the *ubiJ* and *ubiE* mutants exhibited a significant growth defect compared to the wild-type strain (Fig. 2B). The *ubiB* mutant was much more severely affected and did not exceed a final OD₆₀₀ of 0.4 (Fig. 2B). To make sure that the *ubiJ* mutation did not affect *ubiB* expression, the *ubiJ* mutant was transformed with plasmids carrying either *ubiJ* or *ubiB*. Whereas the *ubiJ* mutant was fully comple-

mented by its wild-type allele, a plasmid carrying *ubiB* did not restore the *ubiJ* mutant growth, ruling out any polar effect due to the mutation (Fig. 2C). The wild type and the three mutants were also tested for growth under anaerobic conditions in LB and minimal medium (Fig. 2D and E, respectively). Interestingly, the *ubiJ* mutant was found to grow as well as its wild-type parent in the absence of oxygen in LB, whereas growth of the *ubiB* and *ubiE* mutants was still affected (Fig. 2D). Moreover, the *ubiJ* mutant did not exhibit any significant growth defect in anaerobic minimal medium in the presence of glucose or glycerol supplemented with different carbon sources (Fig. 2E). In contrast, *ubiB* and *ubiE* mutants grew poorly with fumarate, nitrate, or TMAO as the electron acceptor (Fig. 2E), showing that UbiB and UbiE are required for anaerobic respiration, whereas UbiJ is not. Taken together, these data indicate that UbiJ plays an important role in *Salmonella* growth under aerobic conditions but is dispensable under anaerobic conditions.

Coenzyme Q synthesis is abolished in an *ubiJ* mutant under aerobic conditions. UbiE and UbiB were previously shown to be involved in Q_8 biosynthesis in *E. coli*. Therefore, we tested if *Salmonella* paralogs as well as UbiJ were also involved in this biosynthetic pathway. The cellular Q_8 content of the three mutants and of the wild-type strain was measured using electrochemical detection of lipid extracts separated by HPLC (27). None of the three mutants grown aerobically exhibited any detectable Q_8 , whereas wild-type cells reached a level of 107 pmol/mg (wet weight) (Fig. 3A). Surprisingly, under anaerobic conditions, the Q_8 content in the *ubiJ* mutant accounted for 55% of that in the wild-type (35 and 63 pmol, respectively), whereas *ubiB* and *ubiE* mutants did not present any detectable level of Q_8 (Fig. 3A). As previously shown in *E. coli*, an electroactive compound was detected in the *ubiE* mutant grown aerobically with a retention time and UV spectrum similar to those of demethylmethoxy Q_8 (DDMQ $_8$) (see Fig. S1 in the supplemental material) (17). We also measured the cellular content of menaquinone (MK $_8$) and demethylmenaquinone (DMK $_8$) in the different strains. No MK $_8$ was detected in the *ubiE* mutant, as UbiE methyltransferase converts DMK $_8$ into MK $_8$ (Fig. 3B) (19). In contrast, the levels of MK $_8$ were not significantly different in the wild type and the *ubiJ* mutant (Fig. 3B), ruling out any role for UbiJ in menaquinone biosynthesis.

As we showed that Q_8 was still produced anaerobically in an *ubiJ* mutant, precultures were performed in LB with or without oxygen, and the strains were grown under aerobic conditions immediately afterwards (Fig. 3C). We did not find any significant difference for the wild-type strain, which presented a doubling time of 19 min in exponential phase when the preculture was performed anaerobically and 20 min when precultured aerobically (Fig. 3C). The doubling time of the *ubiJ* mutant precultured anaerobically was found to be identical to that of the wild type (19 min), whereas it was much longer when the mutant was precultured aerobically (66 min) (Fig. 3C). This result indicates that a preculture performed under anaerobic conditions restores a wild-type growth rate to the *ubiJ* mutant during the first cycles of cell division, suggesting that accumulation of Q_8 sustains aerobic growth for a few generations. To confirm that Q_8 deficiency was the cause of the aerobic growth defect in the *ubiJ* mutant, we added exogenous ubiquinone 1 (Q_1) in the culture medium, since this component was shown to partially rescue the growth defect of an *ubiCA* mutant (28). Under aerobic conditions, increasing amounts of Q_1 were correlated with an improved growth rate of

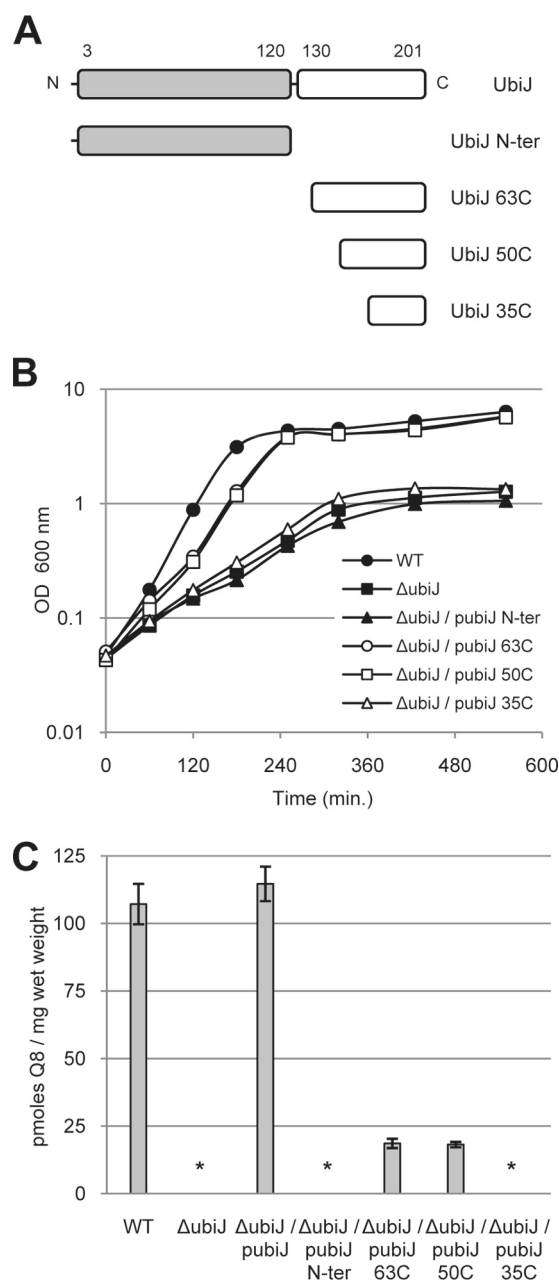


FIG 4 The 50 C-terminal amino acids of UbiJ are sufficient to sustain Q_8 biosynthesis and aerobic growth of the *ubiJ* mutant. (A) Schematic representation of the *ubiJ* plasmids used in this study. UbiJ N-ter represents the plasmid encoding the 120 amino acids at the N terminus, and UbiJ 63C, 50C, and 35C are the plasmids encoding the 63, 50, and 35 amino acids (respectively) at the C terminus. These constructs were cloned in a pBAD24 vector under the control of the pBAD promoter. (B) The wild type (filled circles), the Δ ubiJ mutant (filled squares), and the Δ ubiJ mutant transformed with *pubiJ* N-ter (filled triangles), *pubiJ* 63C (empty circles), *pubiJ* 50C (empty squares), and *pubiJ* 35C (empty triangles) were grown overnight and then diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB under aerobic conditions. Growth was monitored at 600 nm. This experiment was performed in triplicate, identical patterns were obtained, and results of a representative experiment are shown. (C) Quantification of cellular Q_8 content in lipid extracts from the strains previously described and grown in LB under aerobic conditions. Error bars show standard deviations. *, not detected.

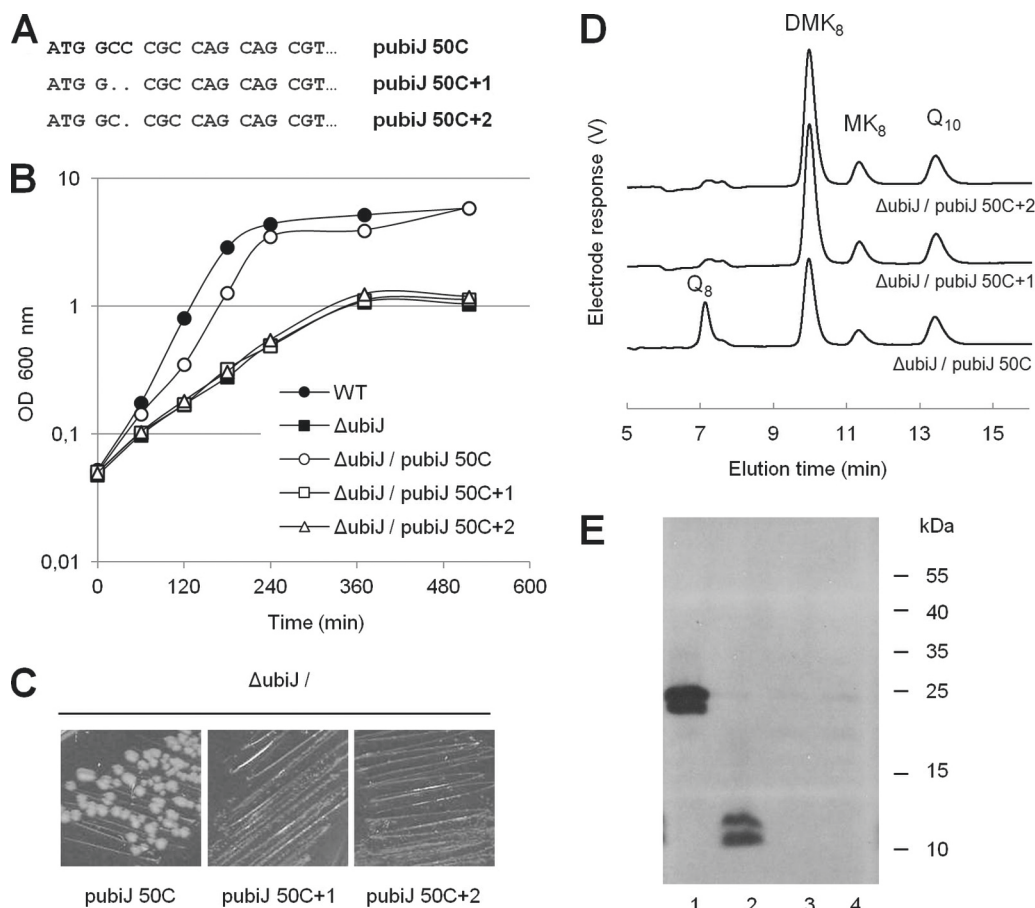


FIG 5 *Salmonella* UbiJ activity relies on protein synthesis. (A) Schematic representation of the 5' ends of the *pubiJ* 50C derivative plasmids. Frameshift mutations were introduced after the start codon of *pubiJ* 50C, yielding *pubiJ* 50C+1 (frameshift of one nucleotide) and *pubiJ* 50C+2 (frameshift of two nucleotides). (B) The wild type (filled circles), the Δ *ubiJ* mutant (filled squares), and the Δ *ubiJ* mutant transformed with *pubiJ* 50C (empty circles), *pubiJ* 50C+1 (empty squares), and *pubiJ* 50C+2 (empty triangles) were grown overnight and then diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB with arabinose under aerobic conditions. Growth was monitored at 600 nm. The experiment was performed at least in triplicate, identical patterns were obtained, and results of a representative experiment are shown. (C) The Δ *ubiJ* strain transformed with *pubiJ* 50C (left), *pubiJ* 50C+1 (middle), and *pubiJ* 50C+2 (right) was grown on LB plates with arabinose for 16 h at 37°C. (D) HPLC separation and electrochemical detection (HPLC-ECD) of lipid extracts from 2 mg of the strains described for panel A and grown in LB with arabinose under aerobic conditions. The peaks corresponding to Q₈, demethylmenaquinone (DMK₈), and menaquinone (MK₈) and to the Q₁₀ standard are marked. (E) Western blot analysis of *pubiJ* (lane 1), *pubiJ* 50C (lane 2), *pubiJ* 50C+1 (lane 3), and *pubiJ* 50C+2 (lane 4) expressed from a pBAD24-derived plasmid in an MG1655 *E. coli* strain. UbiJ variants were separated using 15% SDS-PAGE, blotted onto PVDF membranes, and hybridized with a His₆ tag antibody.

the *ubiJ* mutant in LB (Fig. 3D). Collectively, these data show that UbiJ is required for Q₈ production aerobically and that the absence of coenzyme Q is responsible for the growth limitation observed in the *ubiJ* mutant.

The 50 C-terminal amino acids of *Salmonella* UbiJ allow Q₈ synthesis and aerobic growth of the *ubiJ* mutant. The UbiJ protein is predicted to be composed of two domains: an N-terminal part (amino acids 3 to 120), which was annotated as a sterol-binding domain, and a C-terminal domain, which was found to share 36% identity and 59% similarity with the C terminus of *E. coli* LpxD, an enzyme involved in lipid A biosynthesis (Fig. 4A). To identify the minimal functional unit of UbiJ, the N-terminal and three different versions of the C-terminal domain of UbiJ were cloned in a vector under the control of a P_{BAD} promoter (Fig. 4A). Neither the N-terminal domain nor the 35 C-terminal amino acids offset the growth defect of the *ubiJ* mutant (Fig. 4B). In contrast, the plasmids encoding the 50 or the 63 C-terminal amino acids of UbiJ partially restored the growth defect of the *ubiJ* mu-

tant (Fig. 4B). Accordingly, the constructions carrying the 50 and the 63 C-terminal amino acids in the *ubiJ* mutant allowed an accumulation of 17% of the wild-type content in Q₈, whereas the full-length UbiJ rescued the wild-type level of Q₈ (Fig. 4C). Altogether, these results show that the minimal functional unit of UbiJ consists of its 50 C-terminal amino acids.

The biological activity of *Salmonella ubiJ* relies on the synthesis of a protein. It was recently proposed that in *E. coli*, the 3' region of *ubiJ* includes a new essential 252-nucleotide RNA, which was designated *esre* (22). In order to know if the minimal functional unit identified in *Salmonella* was a small RNA or a polypeptide, we introduced frameshift mutations after the start codon of the *pubiJ* 50C plasmid, yielding *pubiJ* 50C+1 (frameshift of one nucleotide) and *pubiJ* 50C+2 (frameshift of two nucleotides) (Fig. 5A). Whereas the *pubiJ* 50C plasmid was found to complement the growth defect of the *ubiJ* mutant under aerobic conditions, the two plasmids carrying frameshift mutations did not (Fig. 5B). Consistently, when grown on LB plates aerobically, the

ubiJ mutant transformed with *pubiJ* 50C formed individual colonies in 16 h at 37°C, whereas the *ubiJ* mutant transformed with *pubiJ* 50C+1 and *pubiJ* 50C+2 did not (Fig. 5C). The two plasmids carrying the frameshift mutations did not restore Q₈ production in an *ubiJ* mutant grown aerobically, whereas Q₈ was still produced in an *ubiJ* mutant transformed with *pubiJ* 50C (Fig. 5D). Western blot analysis confirmed that *pubiJ* 50C encodes a 7-kDa peptide, whereas *pubiJ* encodes the 23-kDa full-length protein (Fig. 5E). As expected, *pubiJ* 50C+1 and *pubiJ* 50C+2 did not present any cross-reaction signal with the antibody (Fig. 5E). Finally, a “scrambled” plasmid was designed by mutation of 30% of the 261 nucleotides located in the 3′ end of the *Salmonella ubiJ* gene without changing the primary amino acid sequence of the encoded polypeptide (see Fig. S2 in the supplemental material). This plasmid was found to complement the growth defect and to restore Q₈ biosynthesis in the *ubiJ* mutant (see Fig. S2). Altogether, these data show that the aerobic growth-promoting function of the *Salmonella ubiJ* gene relies on the synthesis of a protein.

UbiE, UbiJ, and UbiB are essential for *Salmonella* intracellular proliferation in macrophages. We then investigated the involvement of the *ubiE*, *ubiJ*, and *ubiB* genes in intracellular proliferation of *Salmonella*. RAW 264.7 mouse macrophages were infected with a wild-type strain, an *ubiJ* mutant, and the mutant transformed with an empty vector or *pubiJ*. Bacterial proliferation was assayed by calculating the proliferation index as the ratio of the number of intracellular bacteria at 16 h postinfection to that at 2 h postinfection. The wild-type strain exhibited a proliferation index of 33.6 ± 6.2 , whereas the *ubiJ* mutant presented an index less than 1, indicating that it was unable to proliferate in macrophages (Fig. 6A). Complementation of the *ubiJ* mutant fully restored its intracellular replication (47.5 ± 3.2), whereas the empty plasmid did not change the proliferation index (Fig. 6A). Since anaerobic growth partially restored the Q₈ level in the *ubiJ* mutant, mouse macrophages were infected with inocula grown aerobically or anaerobically (Fig. 6B). Whereas the *ubiJ* mutant exhibited a proliferation index of 0.6 in macrophages infected with an aerobic inoculum, it was found to replicate much more efficiently in macrophages infected with an anaerobic inoculum (5.1 ± 0.6) (Fig. 6B). Interestingly, the ratio of the proliferation index of the wild type (WT) to that of the *ΔubiJ* mutant was found to be about 10 times lower in macrophages infected with an anaerobic inoculum (6.6) than in macrophages infected with an aerobic inoculum (64.6), reflecting the ability of the *ubiJ* mutant to replicate when precultured under anaerobic conditions (Fig. 6B, inset). Next, we found the *ubiB* mutant to be totally impaired for intracellular replication and the proliferation index of the *ubiE* mutant to range from 2.3 to 4.2 (Fig. 6B). In addition, whereas anaerobic precultures modestly improved the proliferation index of the *ubiE* mutant, no change was observed in the *ubiB* mutant (Fig. 6B). These results are consistent with our previous observations showing that the *ubiE* and *ubiB* mutants did not synthesize Q₈ under anaerobic conditions (Fig. 3A). Collectively, these data assign a role for UbiE, UbiJ, and UbiB in *Salmonella* intracellular proliferation and, more generally, highlight the importance of Q₈ production for bacterial virulence.

The *E. coli ubiJ* gene is also required for Q₈ biosynthesis. In *E. coli*, a global approach indicated that the *ubiJ* (*yigP*) gene was essential under aerobic conditions (29). In a separate study, no insertion mutant could be obtained using a plasmid shuffling-based strategy, and *ubiJ* (*yigP*) was also proposed to be essential for

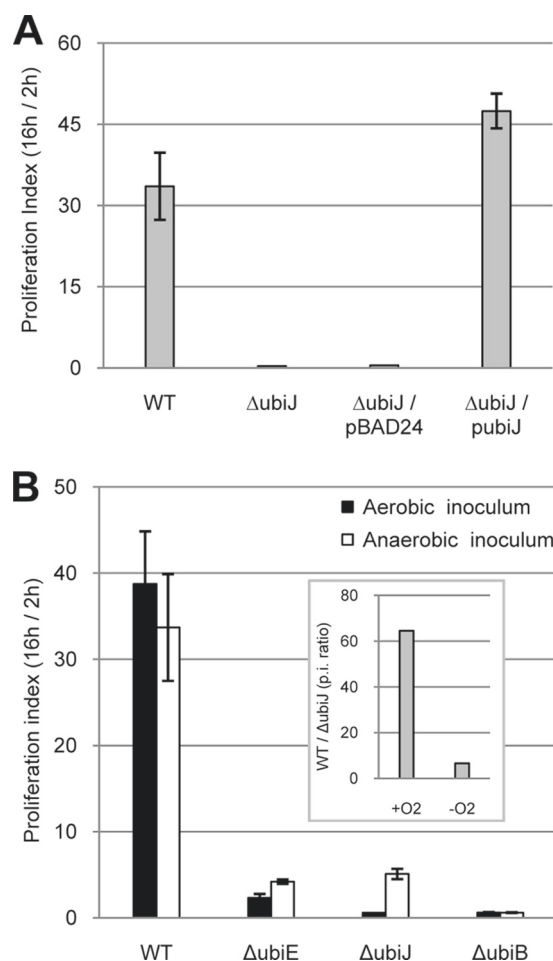


FIG 6 UbiJ is necessary for *Salmonella* intracellular proliferation in macrophages. Opsonized bacteria were phagocytosed by RAW 264.7 cells. At 2 and 16 h postinfection, mouse macrophages were lysed for enumeration of intracellular bacteria (gentamicin protected), as determined by CFU counts. The values are proliferation indexes, calculated as the ratio of the number of intracellular bacteria at 16 h to that at 2 h postinfection. (A) Wild-type, $\Delta ubiJ$, $\Delta ubiJ$ /pBAD24, and $\Delta ubiJ$ /*pubiJ* strains were grown overnight in LB under aerobic conditions before opsonization. (B) Wild-type, $\Delta ubiE$, $\Delta ubiJ$, and $\Delta ubiB$ strains were grown overnight in LB under aerobic (black bars) or anaerobic (white bars) conditions before opsonization. The inset shows the proliferation index ratios (WT/ $\Delta ubiJ$ mutant) calculated from the aerobic (+O₂) and the anaerobic (−O₂) inocula. Results are the means \pm standard deviations from at least three independent experiments, each in triplicate.

E. coli (22). This was clearly at odds with the result obtained with *Salmonella* described above, and we wished to know whether the *ubiJ* gene had differential importance in the two species. Therefore, mutation experiments were undertaken in *E. coli* by deletion and replacement of *ubiJ* by a kanamycin-resistant cassette using the Datsenko and Wanner method (23). Transformants resistant to kanamycin were obtained anaerobically and subsequently tested aerobically. Although we noticed a small-size phenotype for colonies grown under aerobiosis, no difference in viability was observed between the two growth conditions. In liquid cultures, the *ubiJ* strain reached an OD value slightly lower than that of the wild type yet was viable (Fig. 7A). Together, these observations showed that like in *Salmonella*, an *ubiJ* mutation affects the aerobic growth rate, but the mutant is perfectly viable. Moreover, het-

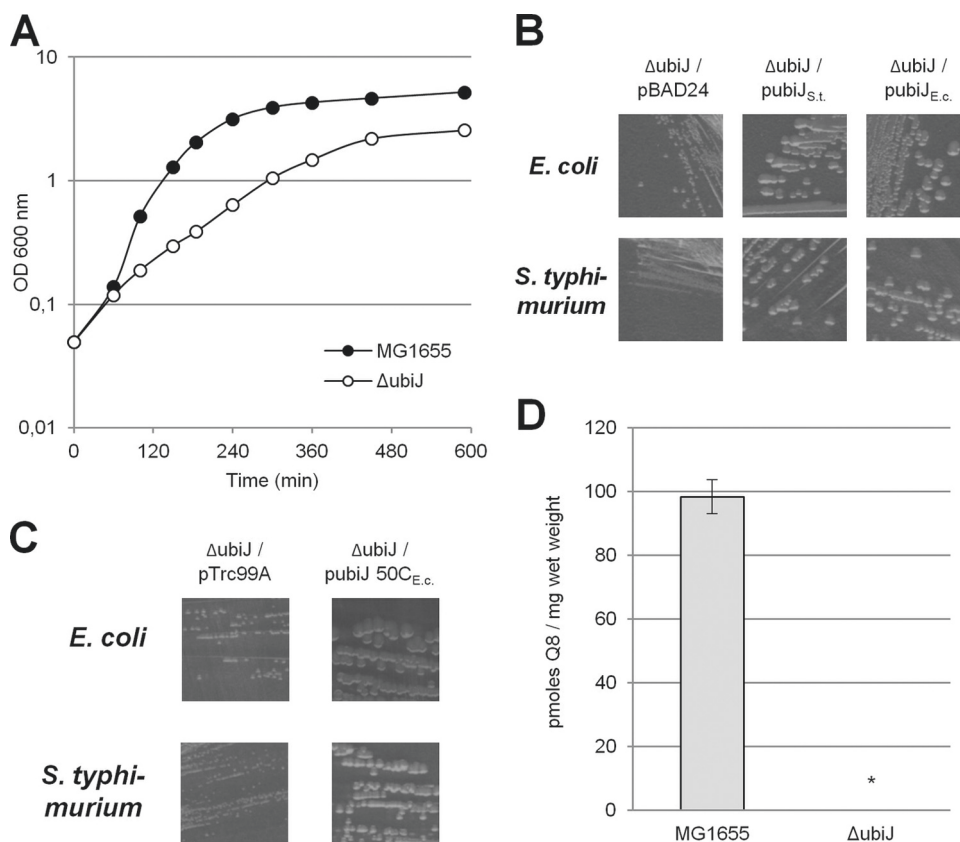


FIG 7 The *E. coli* *ubiJ* gene is also involved in Q₈ biosynthesis and required for aerobic growth. (A) The MG1655 *E. coli* wild-type strain (filled circles) and *ΔubiJ* mutant (open circles) were grown overnight and then diluted at an OD₆₀₀ of 0.05 in LB medium at 37°C under aerobic conditions. Growth was monitored at 600 nm. (B) The *E. coli* *ΔubiJ* (top) and *S. Typhimurium* *ΔubiJ* (bottom) mutants transformed with pBAD24, *E. coli* *ubiJ* (*pubiJ_{E.c.}*), and *S. Typhimurium* *ubiJ* (*pubiJ_{S.t.}*) were grown on LB plates with ampicillin 16 h at 37°C. (C) The *E. coli* *ΔubiJ* (top) and *S. Typhimurium* *ΔubiJ* (bottom) mutants transformed with pTrc99A or *pubiJ* 50C_{E.c.} were grown on LB plates with ampicillin 16 h at 37°C. (D) Quantification of cellular Q₈ content in lipid extracts from WT and *ΔubiJ* cells grown under aerobic conditions. Error bars show standard deviations. *, not detected.

erologous complementation revealed that the growth defect of the *E. coli* mutant was rescued by the *ubiJ* gene of *Salmonella* (Fig. 7B). Conversely, the *ubiJ* gene of *E. coli* complemented the growth defect of the *Salmonella* *ubiJ* mutant (Fig. 7B). We also demonstrated that the growth defects of *E. coli* and *Salmonella* *ubiJ* mutants were rescued by a plasmid carrying the 50 C-terminal amino acids of *E. coli* UbiJ (Fig. 7C). Finally, we tested the involvement of *ubiJ* in Q₈ biosynthesis and did not detect any Q₈ in the *E. coli* *ubiJ* mutant grown aerobically (Fig. 7D). Taken together, these results show that in *E. coli*, as in *Salmonella*, the *ubiJ* gene participates in Q₈ biosynthesis, which is required for aerobic growth.

DISCUSSION

Owing to its electron transfer capacity, Q₈ is a key molecule for adaptation of bacteria to oxygenic growth conditions. Biosynthesis of Q₈ has been studied for some time, but uncertainties remain, and new genes might have to be included in the currently established pathway. In the present study, we identified UbiJ as a new factor involved in Q₈ biosynthesis in *E. coli* and *Salmonella* under aerobiosis. Under such conditions, the *ubiJ* mutants of both species were defective for Q₈ production and accordingly impaired for growth. Moreover, we showed that *Salmonella* *ubiE*, *ubiJ*, and *ubiB* genes were all required for intracellular proliferation. This

latest result evidenced the existence of a link between aerobic respiration and *Salmonella* virulence.

A previous study of the *ubiJ* gene of *E. coli* concluded that it is essential and that it encodes a small RNA rather than a polypeptide (22). Our present characterization of *ubiJ* does not support either of these two notions. First, we could not confirm that *ubiJ* was an essential gene in either *Salmonella* or *E. coli*. Mutants were obtained using standard protocols. Growth analysis of the mutants revealed an alteration in growth rate and maximal OD value reached in liquid cultures, as well as a small-size colony phenotype on plates. However, in both species, the *ubiJ* mutants were fully viable. Regarding the small-RNA issue, in *Salmonella*, Northern analysis and RACE (random amplification of cDNA ends) experiments did not allow us to identify any small RNA in the *ubiJ* gene (data not shown). Moreover, we demonstrated that whereas a DNA region encoding the 50 C-terminal amino acids allowed synthesis of Q₈, two types of frameshift mutations within this DNA piece abolished it. Then, a “scrambled” *ubiJ* allele, including the mutation of 30% of the nucleotides without changing the amino acid sequence, complemented the growth defect and restored Q₈ biosynthesis in the *Salmonella* *ubiJ* mutant. Finally, no transcript was found to be initiated within *ubiJ* in the transcriptional landscape and in a small-RNA study which combined three RNA-

sequencing techniques and two sequencing platforms in *Salmonella* (30). We therefore believe that in *Salmonella* at least, the biological function of *ubiJ* is mediated by a protein. That the same situation might prevail in *E. coli* is strongly supported by the observation that the 50 C-terminal amino acids of UbiJ were sufficient to restore aerobic growth in the *E. coli ubiJ* mutant. Additional studies dedicated to in-depth analysis of the coding capacity of the *ubiJ* gene of *E. coli* are in progress.

UbiE was previously characterized as a methyltransferase (17). UbiB was long thought to intervene at an early step during biosynthesis of Q_8 , but our recent study revealed this step to be catalyzed by a newly discovered monooxygenase called UbiI (9). *ubiE* and *ubiB* mutants did not accumulate Q_8 in *Salmonella* grown either aerobically or anaerobically. Conversely, Q_8 was still produced in the *ubiJ* mutant grown anaerobically. To date, the only mutants known to recover Q_8 biosynthesis under anaerobic conditions are *E. coli* strains in which the aerobic monooxygenase UbiI, UbiH, or UbiF is inactivated (9, 15). UbiJ is unlikely to be a monooxygenase, but it may assist the function of the aerobic monooxygenases. A clue of the role of UbiJ in Q_8 biosynthesis may come from the observation that the C-terminal region of UbiJ shares 36% identity and 59% similarity with the C-terminal domain of *E. coli* LpxD, an enzyme catalyzing the acylation of the lipid A. In LpxD, the C-terminal helical domain caps the hydrophobic cleft that binds the acyl chain (31). This domain seems to be of primary importance, because C-terminal truncations of LpxD yielded inactive proteins (31). Interestingly, our deletion analysis of *ubiJ* revealed that the 50 C-terminal amino acids were sufficient to sustain Q_8 biosynthesis and growth. Thus, an attractive possibility is that UbiJ exhibits, like LpxD, the ability to interact with lipid components. As a working hypothesis, we propose that UbiJ could serve as a carrier of the isoprenoid hydrophobic tail prior to the action of monooxygenases and methyltransferases. Alternatively, it could chaperone prenylated intermediates during the biosynthetic process and, more specifically, during aerobic hydroxylation steps.

The *ubiJ* mutant retained the ability to grow aerobically in LB to an OD of 1 and was found to be killed within macrophages (proliferation index < 1). Macrophages infected with an anaerobic inoculum of the *ubiJ* mutant, in which Q_8 was still produced, yielded a proliferation index of >5. This clearly established the requirement for Q_8 for efficient intracellular proliferation. Several possibilities for connecting Q_8 defects and virulence attenuation can be envisioned. A first obvious possibility is that *Salmonella* uses aerobic respiration to grow intracellularly. Q_8 being necessary for aerobic respiration, any defect in its biosynthesis would be predicted to lead to defects in intracellular growth. A second possibility relates to the role of Q_8 as an antioxidant in reducing the production rate of O_2^- and H_2O_2 in the plasma membrane (8). However, we previously reported that a multiplicity of catalases and peroxidases endow *Salmonella* with a high capacity to cope with oxidative stress (32), and it would be surprising if a lack of Q_8 unbalanced the enzymatic defenses. A third possibility is that a defect in Q_8 prevents proton motive force-dependent processes needed for virulence. For instance, flagellar motility, a key process employed by pathogenic bacteria during the course of infection, is dependent upon proton motive force (33). In summary, our results highlight the importance of Q_8 in bacterial virulence and strongly support the idea that *Salmonella* intracellular lifestyle re-

lies on aerobic respiration and oxygen availability to survive and proliferate within macrophages.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to the members of Frédéric Barras' group for fruitful discussions.

This work was funded by the CNRS and Aix-Marseille Université (AMU). B.P. was funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). F.P. acknowledges the financial support of the ANR, grant pABA-CoQ.

REFERENCES

1. Søballe B, Poole RK. 1999. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* 145:1817–1830. <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-145-8-1817>.
2. Hägerhäll C. 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* 1320:107–141. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00019-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00019-4).
3. San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, Vadali RV, Yang YT, Horton E, Rudolph FB, Sanyal B, Blackwood K. 2002. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 4:182–192. <http://dx.doi.org/10.1006/mben.2001.0220>.
4. Wallace BJ, Young IG. 1977. Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA*[−] *menA*[−] double quinone mutant. *Biochim. Biophys. Acta* 461:84–100.
5. Simon J, van Spanning RJ, Richardson DJ. 2008. The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:1480–1490. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.09.008>.
6. Sharma P, Teixeira de Mattos MJ, Hellingwerf KJ, Bekker M. 2012. On the function of the various quinone species in *Escherichia coli*. *FEBS J.* 279:3364–3373. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08608.x>.
7. Grimaldi S, Schoep-Cohenet B, Ceccaldi P, Guigliarelli B, Magalon A. 2013. The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family: a catalytic workhorse in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1827:1048–1085. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.011>.
8. Søballe B, Poole RK. 2000. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146:787–796.
9. Hajj Chehade M, Loiseau L, Lombard M, Pecqueur L, Ismail A, Smadja M, Golinelli-Pimpaneau B, Mellot-Draznics C, Hamelin O, Aussel L, Kieffer-Jaquinod S, Labessan N, Barras F, Fontecave M, Pierrel F. 2013. *ubiI*, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 288:20085–20092. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.480368>.
10. Xie LX, Hsieh EJ, Watanabe S, Allan CM, Chen JY, Tran UC, Clarke CF. 2011. Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast *coq8* mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1811:348–360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2011.01.009>.
11. Xie LX, Ozeir M, Tang JY, Chen JY, Jaquinod SK, Fontecave M, Clarke CF, Pierrel F. 2012. Overexpression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* *coq* null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the coenzyme Q6 biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 287:23571–23581. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.360354>.
12. Young IG, McCann LM, Stroobant P, Gibson F. 1971. Characterization and genetic analysis of mutant strains of *Escherichia coli* K-12 accumulating the ubiquinone precursors 2-octaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone and 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone. *J. Bacteriol.* 105:769–778.
13. Young IG, Stroobant P, Macdonald CG, Gibson F. 1973. Pathway for ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: gene-enzyme relationships and intermediates. *J. Bacteriol.* 114:42–52.
14. Alexander K, Young IG. 1978. Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 17:4745–4750. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00615a023>.
15. Alexander K, Young IG. 1978. Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 17:4750–4755. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00615a024>.
16. Hsu AY, Poon WW, Shepherd JA, Myles DC, Clarke CF. 1996. Complementation of *coq3* mutant yeast by mitochondrial targeting of the

- Escherichia coli* UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry* 35:9797–9806. <http://dx.doi.org/10.1021/bi9602932>.
17. Lee PT, Hsu AY, Ha HT, Clarke CF. 1997. A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the *Escherichia coli* *ubiE* gene. *J. Bacteriol.* 179:1748–1754.
 18. Poon WW, Barkovich RJ, Hsu AY, Frankel A, Lee PT, Shepherd JN, Myles DC, Clarke CF. 1999. Yeast and rat Coq3 and *Escherichia coli* UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 274:21665–21672. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.31.21665>.
 19. Wissenbach U, Ternes D, Unden G. 1992. An *Escherichia coli* mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration. *Arch. Microbiol.* 158:68–73. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00249068>.
 20. Poon WW, Davis DE, Ha HT, Jonassen T, Rather PN, Clarke CF. 2000. Identification of *Escherichia coli* *ubiB*, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182:5139–5146. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.18.5139-5146.2000>.
 21. Kim JN, Youm GW, Kwon YM. 2008. Essential genes in *Salmonella enteritidis* as identified by TnAraOut mutagenesis. *Curr. Microbiol.* 57:391–394. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-008-9225-6>.
 22. Chen Z, Wang Y, Li Y, Li Y, Fu N, Ye J, Zhang H. 2012. Esre: a novel essential non-coding RNA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 586:1195–1200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.010>.
 23. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:6640–6645. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
 24. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177:4121–4130.
 25. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413:852–856. <http://dx.doi.org/10.1038/35101614>.
 26. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25:147–150. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01540-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01540-6).
 27. Ozeir M, Mühlhoff U, Weibert H, Lill R, Fontecave M, Pierrel F. 2011. Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. *Chem. Biol.* 18:1134–1142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.07.008>.
 28. Zhu J, Sánchez A, Bennett GN, San KY. 2011. Manipulating respiratory levels in *Escherichia coli* for aerobic formation of reduced chemical products. *Metab. Eng.* 13:704–712. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.09.006>.
 29. Tong X, Campbell JW, Balázs G, Kay KA, Wanner BL, Gerdes SY, Oltvai ZN. 2004. Genome-scale identification of conditionally essential genes in *E. coli* by DNA microarrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322:347–354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.110>.
 30. Kröger C, Dillon SC, Cameron AD, Papenfort K, Sivasankaran SK, Hokamp K, Chao Y, Sittka A, Hébrard M, Händler K, Colgan A, Leekitcharoenphon P, Langridge GC, Lohan AJ, Loftus B, Lucchini S, Ussery DW, Dorman CJ, Thomson NR, Vogel J, Hinton JC. 2012. The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:E1277–E1286. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1201061109>.
 31. Bartling CM, Raetz CR. 2009. Crystal structure and acyl chain selectivity of *Escherichia coli* LpxD, the N-acyltransferase of lipid A biosynthesis. *Biochemistry* 48:8672–8683. <http://dx.doi.org/10.1021/bi901025v>.
 32. Hébrard M, Viala JP, Méresse S, Barras F, Aussel L. 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J. Bacteriol.* 191:4605–4614. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00144-09>.
 33. Terashima H, Kojima S, Homma M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 270:39–85. [http://dx.doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01402-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01402-0).
 34. Py B, Loiseau L, Barras F. 1999. Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. *J. Mol. Biol.* 289:659–670. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2803>.

Le coenzyme Q est une molécule lipophile rédox rencontrée chez les eucaryotes et chez la plupart des procaryotes. La structure de Q correspond à une benzoquinone substituée par une chaîne polyisoprényle dont la longueur varie selon les organismes. Q joue le rôle de transporteur d'électrons dans les chaînes respiratoires d'où provient la plupart de l'énergie de la cellule. La biosynthèse de Q chez la bactérie *Escherichia coli* comporte huit étapes et implique au moins neuf protéines (UbiA-UbiH et UbiX). Trois réactions d'hydroxylation sont nécessaires pour la biosynthèse de Q₈ en conditions aérobies. Alors que les protéines UbiH et UbiF présentent des homologies de séquence avec des monooxygénases à flavine connues pour catalyser des réactions d'hydroxylation, UbiB qui a été proposée comme étant la troisième hydroxylase, présente uniquement une homologie de séquence avec des kinases. Nous rapportons dans ce travail que la protéine VisC, renommée UbiI, catalyse la réaction d'hydroxylation auparavant attribuée à UbiB. Nous avons également identifié deux nouvelles protéines (YigP et YqiC, renommées respectivement UbiJ et UbiK) importantes pour le métabolisme de Q chez *Escherichia coli* puisque leur mutation diminue fortement le contenu en Q des souches mutantes. Ces protéines interagissent avec la plupart des protéines connues pour participer à la biosynthèse de Q ce qui implique l'existence d'un complexe de biosynthèse de Q. En utilisant des approches biochimiques et protéomiques, nous avons pu mettre en évidence un complexe impliquant plusieurs protéines Ubi et notamment UbiJ et UbiK. Ces deux protéines semblent avoir un rôle dans l'assemblage et/ou la stabilisation de ce complexe multiprotéique. Enfin, nous nous sommes intéressés à la biosynthèse de Q dans des conditions de cultures anaérobies. Nos résultats montrent l'existence « d'hydroxylases anaérobies », inconnues à ce jour, qui remplacent les hydroxylases aérobies UbiH, UbiI et UbiF. Grâce à une approche phylogénétique, nous identifions un gène important pour la biosynthèse de Q uniquement en conditions anaérobies suggérant une réorganisation de la biosynthèse de Q entre ces deux environnements fréquemment rencontrés par *E. coli*. L'ensemble de nos résultats a permis d'améliorer notre connaissance de la voie de biosynthèse procaryote de Q grâce à la découverte de nouveaux gènes impliqués dans ce processus et grâce à l'identification de la fonction moléculaire de certaines protéines.

Ubiquinone (Q) is a lipophilic compound that plays an important role in electron and proton transport in the respiratory chains of *Escherichia coli*. Besides this important role in energy production, Q also functions as a membrane soluble antioxidant. The biosynthesis of Q₈ requires eight reactions and involves at least nine proteins (UbiA-UbiH and UbiX) in *Escherichia coli*. Three of these reactions are hydroxylations resulting in the introduction of a hydroxyl group on carbon atoms at position 1, 5 and 6 of the aromatic ring. The C1 and C6 hydroxylation are well characterized whereas the C5 hydroxylation has been proposed to involve UbiB, a protein kinase without any sequence homology with monooxygenase. In this work, by genetic and biochemical methods we provide evidence that VisC which we renamed UbiI, displays sequence homology with monooxygenases and catalyzes the C5 hydroxylation, not UbiB. We have identified two new genes, *yqiC* and *yigP* (renamed UbiJ and UbiK) which are required only for Q₈ biosynthesis in aerobic conditions. The exact role of the corresponding proteins, renamed UbiJ and UbiK, remains unknown. These proteins are able to interact with other Ubi proteins to be able to produce Q supporting the protein complex hypothesis. Our progress on the characterization of an Ubi-complex regrouping several Ubi proteins suggest that UbiJ and UbiK may fulfill functions related to the Ubi-complex stability. Mutants affected in hydroxylation steps are deficient for Q₈ in aerobic conditions but recover a wild type Q₈ content when grown in anaerobic conditions. This intriguing observation supports the existence of an alternative hydroxylation system independent from dioxygen which has not been characterized so far. By phylogenetic studies, we have identified a new gene in which the deletion affect the biosynthesis of Q only in anaerobic conditions suggesting a reorganization of Q biosynthesis in these two conditions. Our results has improved our knowledge of the prokaryotic Q biosynthetic pathway through the discovery of new genes involved in this process and through the identification of the molecular function of some proteins.